

Винахід відноситься до аналітичних методів в біохімії, а саме до методів визначення індометацину методом високоефективної рідинної хроматографії.

Серед методів визначення концентрації індометацину в крові вагома частка належить до методів високоефективної рідинної хроматографії. Ці методи допомагають контролювати параметри фармакокінетики цього препарату, що дає змогу призначати препарат в оптимальній дозі і в певній кількості. Саме для цієї мети і призначений запропонований метод. Сфера практичного застосування цього методу обумовлює рівень вдосконалення його чутливості. Оскільки нижня межа терапевтичної дози індометацину дорівнює 0,15мкг/мл, то недоцільним є намагання значно покращувати цей показник методу за рахунок його ускладнення, що у свою чергу призведе до уповільнення та подорожчання процедури. Цілком достатньо, щоб чутливість методу складала 5-10% від нижньої межі терапевтичної дози, тобто була в межах 15нг/мл.

Всі відомі методи визначення індометацину розподіляються на дві групи. Перша група методів базується на традиційній послідовності операцій, що пов'язана з виділенням індометацину з біологічної рідини екстракційними методами з використанням органічних розчинників, наприклад дихлорметану [Smith P.C., Benet L.Z. High-performance liquid chromatographic method for the determination of indomethacin and its two primary metabolites in urine. // J. Chromatogr. -1984. -Mar, 9, Vol.306. -P.315-321], а також [Plasma indomethacin assay by reversed-phase ion pair high pressure liquid chromatography / J.H.Jonkman, W.J.Van der Boon, R.Schoenmaker, A.Holtkamp // Pharm.Weekbl.Sci. -1983. -Dec, 16 No 5(6), P.313-318]. Подальше видалення органічного розчинника та реекстракція індометацину займає до 4-х годин [Jaworowicz D.J., Filipowski M.T., Boje K.M. Improved high-performance liquid chromatographic assay for nimesulide.//J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. -1999. -Feb. 19. -723 (1-2).-P.293-299]. Після реекстракції проба вводиться до хроматографічної колонки, в переважній більшості C18, наприклад Hypersil BDS C18 (5 microm particle size; 250x4.6mm) [Niopas I., Mamzoridi K. Determination of indomethacin and mefenamic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. -1994. -Jun, V. 17, No 656(2). -P.447-450]. Елюенти також не відрізняються різноманітністю - використовуються переважно варіації суміші метанолу або ацетонітрилу та фосфатного або цитратного буферу (рН3,0-4,5), де доля органічного розчинника складає приблизно 40-60%. Спектрофотометричне детектування визначення ведеться на довжині хвилі 230-280нм, причому межа визначення дорівнює 10нг/мл [Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M. Fluorimetric determination of indomethacin in human serum by high-performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical reaction with hydrogen peroxide./AJ. Chromatogr. -1989. -V. 21, No 491 (2). -P.389-396].

Проте, така традиційна послідовність дій має певні недоліки. Так, під час екстрагування індометацину з подальшою реекстракцією спостерігається втрата певної кількості речовини - величина втрат для індометацину може сягати 30%. Ми можемо бути впевненими в тому, що втрачена частка є постійною для ряду паралельних проб лише в тому випадку, коли аналіз проводиться спеціалістом вищої кваліфікації. Це не може не впливати на вартість аналізу. Також на вартість аналізу впливає ускладнення процесу визначення додатковими ступенями методики, що потребує додаткового часу.

Тому в розвинутих країнах Заходу, де більша частина вартості аналітичного визначення припадає на оплату праці спеціаліста, набула поширення друга група методів визначення індометацину, які базуються на використанні твердофазної екстракції [Wang Z., Dsida R.M., Avram M.J. Determination of ketorolac in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection.// J.Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. -2001 May 5. -No 755(1-2). -P.383-386]. Тривалість аналізів, які виконуються з використанням таких методів є невеликою, трудомісткість також незначна. Адже через твердофазно-екстракційний картридж до колонки можна вводити безпосередньо рідину, яка має аналізуватися на вміст індометацину - навіть сироватку або плазму крові. Але в умовах нашої країни ця група методів поки що економічно недоцільна. Пов'язано це з високою, за нашими мірками, ціною - приблизно 50-70грв за один картридж для твердофазної екстракції, який використовується для проведення одного аналітичного визначення.

Таким чином, з одного боку існує група методів по визначенню вмісту індометацину з низькою собівартістю, але з великими витратами кваліфікованої ручної праці. Інша група методів не потребує значної кваліфікованої праці, проте має велику собівартість завдяки витратним матеріалам.

Для спрощення методики визначення індометацину, підвищення її точності за рахунок усунення втрат речовини в процесах екстрагування-реекстрагування, зниження трудомісткості аналітичного визначення, і було запропоновано вдосконалити методи першої групи шляхом зміни методу пробопідготовки.

Найбільш близьким за сукупністю ознак до винаходу є метод визначення індометацину у біологічних рідинах з використанням екстракції до дихлорметану з подальшою реекстракцією рідиною із складом хроматографічного елюента (0,5% оцтова кислота -ацетонітрил у співвідношенні 50:50 за об'ємом) [Determination of indomethacin residues in poultry by high-performance liquid chromatography/ C.Cristofol, B.Perez, M.Pons, et al. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. -1998, V. 29. -No 709 (2). -P.310-314].

В основу винаходу поставлено задачу спростити та здешевити метод визначення індометацину у біологічній рідині, скоротити час на пробопідготовку. Це стає можливим завдяки заміні міжфазної екстракції (рідина-рідина або у твердофазному патроні) на однофазну екстракцію у ацетонітрил. Завдяки тому, що ацетонітрил є ефективним білокосаджувачим агентом, його застосування дозволяє уникнути цілої низки операцій - екстрагування, видалення розчинника, реелюювання. Виключення цієї низки операцій, у свою чергу, зводить втрати індометацину під час пробопідготовки практично до нуля. Зниження концентрації індометацину у рідині, яка вводиться в колонку, не є критичним, чому сприяють велика чутливість сучасних хроматографічних детекторів у поєднанні із значною терапевтичною концентрацією індометацину в крові.

0,2мл сироватки крові підкислювали 0,02мл 1М соляної кислоти і після перемішування додавали внутрішній стандарт - 0,05мл розчину німесулід (Sigma, USA) з концентрацією 5мкг/мл, а після повторного перемішування - 0,6мл ацетонітрилу. Проба енергійно струшувалась протягом однієї хвилини. За цей час практично весь індометацин, який був зв'язаний з білковими молекулами переходить до розчину. Після цього пробу центрифугували при 3000об/хв протягом 30хв. Надосадову рідину фільтрували на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45мкм.

Кількісне визначення індометацину проводили на високоефективному рідинному хроматографі HP-1100 "Leonardo" на колонці розмірами 125x4мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS C18 з розмірами гранул 5мкм. В колонку вводили 20мкл відфільтрованої надосадової рідини. Застосовано ізократичне елюювання зі складом мобільної фази (за об'ємом) - 50% 0,03М цитратного буферу pH=3,6 і 50% ацетонітрилу, швидкість елюювання - 600мкл/хв, температура колонки 20°C. Детектування індометацину проводилось при довжині хвилі 254нм. За цих умов час виходу індометацину з колонки складав 8,45хв., а час виходу внутрішнього стандарту (німесулід) - 5,92хв. В діапазоні концентрацій індометацину від 0,2 до 50мкг/мл зберігається пропорційна залежність, між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі. Встановлено, що відношення площі піків німесулід (внутрішнього стандарту) до площі піків індометацину є величиною сталою і дорівнює 0,565. Концентрація індометацину в сироватці крові розраховували за наступною формулою:

$$C = \frac{S_n \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot C_i}{S_i},$$

де: S_n - площа піку індометацину;

S_i - площа піку індометацину;

K_1 - калібрувальний коефіцієнт - відношення площ піків індометацину та індометацину, взятих в рівних концентраціях (за нашими даними $K_1=0,565$);

K_2 - коефіцієнт розведення - відношення об'єму проби після додавання всіх компонентів до вихідного об'єму проби (в умовах проведення визначення $K_2=4,35$);

C_i - концентрація внутрішнього стандарту в кожній пробі ($C_i=5,75$ мкг/мл).

Також було досліджено метрологічні параметри методу визначення індометацину. Виявилось, що пропонований нами метод, відрізняється точністю, достатньою відтворюваністю та високою чутливістю. Так, при визначенні індометацину, доданого до сироватки у концентраціях від 0,50 до 4,00мкг/мл (серіями по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 3,5% для довірчого інтервалу $P=0,95$. Нижня межа визначення індометацину складала 15нг/мл (відношення "сигнал/шум" >10).