

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ЭКСТРАКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ФОТОЛОН В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Precise and replicable methods of extraction of the photosensitizer Photolon from the blood plasma and further quantification by means of the high-performance liquid chromatography were developed and validated. For developed methods basic analytical characteristics, in particular, efficacy of the extraction, repeatability of the extraction procedure and quantitative assay, accuracy of the analysis, sensitivity of the analysis, specificity of the test and stability of its' results, were studied. Developed methods were in the sequel applied for the quantification of the photosensitizer within the study of Photolon pharmacokinetics and bioavailability.

Фотолон – современный фотосенсибилизатор (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ), разработанный специалистами РУП «Белмедпрепараты». Фотолон зарегистрирован и разрешен к клиническому применению в Республике Беларусь и в Российской Федерации. На сегодняшний день накоплен богатый клинический опыт применения Фотолон при лечении злокачественных опухолей кожи и слизистых оболочек [1, 2], диссеминированных форм меланомы [2, 3], центрального рака легкого [4], цервикальных интраэпителиальных неоплазий [2, 5], центральной инволюционной хориоретинальной неоваскуляризации [6]. Проводятся клинические исследования по применению метода ФДТ с препаратом Фотолон при лечении злокачественных опухолей головного мозга [7], рака мочевого пузыря [8].

Несмотря на достаточно большое количество публикаций, касающихся фармакологических свойств ФС Фотолон, объективные сведения о параметрах его фармакокинетики до сих пор не получены. Во многом это обусловлено отсутствием методик подготовки проб, обеспечивающих корректный количественный анализ ФС в биологических жидкостях, в частности в плазме (сыворотке) крови. Фотолон представляет собой молекулярный комплекс хлорина еб и низкомолекулярного поливинилпирролидона (ПВП) [1], который существенно отличается по физико-химическим и фармакотоксикологическим характеристикам от свободного хлорина еб. В связи с этим подходы, традиционно используемые для извлечения из биологических жидкостей тетрапиррольных соединений, нуждаются в серьезной модификации с учетом химической природы и состава Фотолон.

Принимая во внимание изложенное, целью настоящей работы являлась разработка простой и воспроизводимой методики экстракции ФС Фотолон из плазмы крови для последующего анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В ходе исследования решались задачи выбора подходящего экстрагента для проведения жидкостной экстракции исследуемого ФС из плазмы крови, изучения влияния соотношения объемов анализируемого образца и экстрагента, продолжительности экстракции на полноту этого процесса для исследуемого препарата, а также изучения таких показателей, как специфичность методики, ее воспроизводимость, степень извлечения, стабильность полученных экстрактов при хранении.

Материал и методика

Эксперименты выполнены на модельных образцах плазмы крови кролей породы Шиншилла, содержащих известное (заранее заданное) количество изучаемого ФС. Для получения плазмы пробы цельной крови объемом 5 мл каждая забирали из ушной вены животного в пластиковые пробирки с гепарином, инкубировали в течение 15 мин в термостате при температуре 37 °С и затем охлаждали до температуры 12 °С. Эритроцитарную массу отделяли путем двукратного центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин. Полученную плазму крови замораживали при температуре –22 °С и хранили в морозильной камере непосредственно до проведения эксперимента. В дальнейшем готовили образцы с известными концентрациями ФС путем внесения водных растворов последнего в плазму крови в заданных концентрациях. Для этого в пластиковые пробирки объемом 3 мл помещали по 0,5 мл плазмы крови. К первой группе образцов приливали по 0,01 мл раствора исследуемого ФС с концентрацией 0,25 мг/мл, ко второй – по 0,08 мл этого же раствора. Полученные растворы перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Было приготовлено по 5 образцов для каждого уровня концентрации изучаемого ФС. В качестве внешнего стандарта использовали раствор натриевой соли хлорина еб в метаноле с концентрацией 0,0017 мг/мл (по хлорину еб).

На основании анализа литературы [9–14] для проведения жидкостной экстракции исследуемого ФС из плазмы крови были выбраны следующие органические растворители:

- 1) метанол (95 %);
- 2) смесь метанол : аммиак (7:1);
- 3) ацетон;
- 4) смесь ацетон : аммиак (7:1);
- 5) смесь метанол : ДМСО (4:1).

Экстракцию ФС Фотолон из плазмы крови осуществляли следующим образом. К образцу объемом 0,5 мл приливали 2 мл одного из исследуемых экстрагентов и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, интенсивно встряхивая на вортекс-миксере Genius-3 (IKA WERKE, Германия). Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 об/мин на центрифуге Biofuge Primo, оборудованной угловым ротором Highconic-Primo (Heraeus, Германия). Полученный супернатант аккуратно отбирали, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и хроматографировали.

Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе Varian, включающем насос Varian 9012 и спектрофотометрический детектор Varian 9050, по ранее разработанной и валидированной методике количественного определения хлорина еб в растворах [15]. Условия проведения ВЭЖХ-анализа: колонка Waters XTerra RP-18 150×4,6 мм, подвижная фаза А: 0,08 % раствор трифторуксусной кислоты; Б: ацетонитрил, градиентное элюирование 45÷100 % фазы Б в течение 18 мин, поток 1 мл/мин, температура 40 °С, объем петли 100 мкл, длина волны детектора 407 нм. Количественное содержание ФС Фотолон (по хлорину еб) в плазме крови определяли методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения Varian Star 4.51.

Для разработанной методики экстракции и количественного определения исследуемого ФС в плазме крови изучались основные аналитические характеристики. С этой целью были приготовлены образцы плазмы крови, содержащие заранее рассчитанное количество препарата – 15,8; 1,58 и 0,16 мкг/мл. Для каждого из приготовленных уровней содержания ФС Фотолон в модельных образцах плазмы проводилось 4 независимых определения концентрации препарата.

Степень экстракции рассчитывали как соотношение обнаруженной концентрации ФС Фотолон (в пересчете на хлорин еб), полученной при использовании калибровочного раствора соответствующего уровня, к заданной концентрации препарата.

Воспроизводимость оценивали путем последовательного анализа 4 образцов, приготовленных независимо для каждого уровня содержания соединения. Рассчитывали относительное и абсолютное стандартные отклонения среднего результата для каждой из концентраций.

Точность методики оценивали путем сравнения концентрации ФС Фотолон (с учетом средней степени экстракции), установленной хроматографическим методом и реально приготовленной в плазме (рассматривалась как 100 %).

Чувствительность хроматографической методики определяли на основании значения тангенса угла наклона градуировочного уравнения зависимости концентрации ФС от площади хроматографического пика. Пределу обнаружения соответствовала концентрация, в три раза превышающая шум базовой линии.

Для оценки *стабильности* приготовленных экстрактов через 24 ч проводился повторный анализ полученных извлечений для каждой из концентраций. При этом обращали внимание на изменение концентрации ФС в растворе и появление на хроматограмме новых пиков (по всей видимости, продуктов метаболизма или деградации хлорина еб).

Для оценки *специфичности* использованной методики, т. е. для выявления возможного влияния эндогенных порфиринов на результаты анализа количественного содержания ФС Фотолон в плазме крови, были проанализированы «холостые» образцы плазмы, подвергнутые экстракции по описанной методике.

Пригодность хроматографической системы оценивали по хроматограммам образцов после экстракции для каждого из уровней концентрации ФС при помощи программы System Suitability из пакета программ хроматографической станции Varian.

Результаты и их обсуждение

Исследована возможность использования следующих органических растворителей в качестве экстрагентов для жидкостной экстракции ФС Фотолон из плазмы крови. Установлено, что при применении в качестве экстрагента смеси [метанол : аммиак (7:1)] или смеси [ацетон : аммиак (7:1)] полученный конечный экстракт имел сильно щелочную реакцию раствора (рН=11,3), что делало невозможным проведение прямого анализа количественного содержания исследуемого ФС в экстракте

методом ВЭЖХ. Доведение рН экстракта до нейтрального при помощи 10 % раствора лимонной кислоты приводило к образованию плотного осадка, не поддающегося фильтрованию. Таким образом, использование названных смесей в качестве экстрагентов для получения проб и их последующего анализа методом ВЭЖХ было признано затруднительным.

На хроматограммах экстрактов из «холостых» образцов плазмы, полученных с ацетоном в качестве экстрагента, присутствовал пик неизвестного соединения со временем удерживания 7,05 мин, что совпадало со временем удерживания хлорина еб и затрудняло расчет количественного содержания ФС Фотолон в экстракте. В результате подходящим экстрагентом для жидкостной экстракции ФС Фотолон из плазмы крови был выбран раствор [метанол : ДМСО (4:1)].

В следующей серии экспериментов изучалось влияние продолжительности экстракции на полноту этого процесса для исследуемого соединения из плазмы крови. В табл. 1 приведены данные о полноте экстракции ФС Фотолон из образцов плазмы крови при проведении жидкостной экстракции смесью [метанол : ДМСО (4:1)] в течение 5, 10, 15, 30 и 60 мин. Установлено, что с увеличением продолжительности процесса полнота экстракции исследуемого препарата из плазмы крови снижается. Сделано предположение, что это может быть обусловлено связыванием исследуемого ФС с компонентами осадка, который образовывался в результате осаждения белковых компонентов плазмы крови добавлением органических растворителей. Возможно, это препятствовало переходу препарата в органическую фазу в системе плазма/экстрагент.

Таблица 1

Полнота экстракции ФС Фотолон из плазмы в зависимости от продолжительности экстракции смесью органических растворителей [метанол : ДМСО (4:1)]

Продолжительность экстракции, мин	Полнота экстракции ФС Фотолон из образцов плазмы, %
5	81,0±2,3
10	79,0±1,7
15	78,0±1,9
30	53,8±2,1
60	34,8±4,3

Изучено влияние объемных соотношений метанола и ДМСО в составе экстрагента на полноту экстракции ФС Фотолон из плазмы (табл. 2). Установлено, что при использовании соотношения [метанол : ДМСО (1:1)] полнота экстракции исследуемого ФС из плазмы составляет 58,8±2,2 %, тогда как при соотношении указанных растворителей (4:1) полнота экстракции возрастает до 80,6±3,1 %.

Таблица 2

Влияние объемных соотношений метанола и ДМСО в составе экстрагента на полноту экстракции ФС Фотолон из плазмы крови (продолжительность экстракции 5 мин)

Состав экстрагента	Полнота экстракции, %
[Метанол : ДМСО (4:1)]	80,6±3,1
[Метанол : ДМСО (3:2)]	71,1±4,5
[Метанол : ДМСО (1:1)]	58,8±2,2

Наиболее оптимальным соотношением объемов плазмы и экстрагента (среди рассмотренных комбинаций) является (4:1). Подобное соотношение обеспечивало экстракцию 83,3±1,6 % исследуемого ФС (табл. 3).

Таблица 3

Влияние объемных соотношений плазмы крови и экстрагента на полноту экстракции ФС Фотолон (продолжительность экстракции 5 мин)

Соотношение	Полнота экстракции, %
1:8	61,7±3,5
1:4	83,3±1,6
1:2	45,4±4,3
1:1	40,1±1,8

Изучено влияние присутствия в составе экстрагента поверхностно-активного вещества (ЭДТА) и веществ, разрушающих водородные связи (мочевина), на полноту экстракции (табл. 4). Присутствие в составе экстрагента мочевины (10 % раствор в диметилсульфоксиде) позволяет повысить полноту экстракции ФС Фотолон из плазмы до 86,2±2,2 %.

**Влияние добавления ЭДТА и мочевины в экстрагент на полноту экстракции ФС Фотолон
(продолжительность экстракции 5 мин)**

Состав экстрагента	Средняя степень экстракции, %
[Метанол : ДМСО:ЭДТА (4:1:0,5)]	77,3±3,9
[Метанол : ДМСО:ЭДТА (4:1:0,5)]	74,7±2,6
[Метанол : 10 % р-р мочевины в ДМСО (4:1)]	89,3±4,0
[Метанол : 20 % р-р мочевины в ДМСО (4:1)]	86,2±2,2

В результате проведенных экспериментов были подобраны наиболее оптимальные условия жидкостной экстракции ФС Фотолон из плазмы крови. Разработанная методика экстракции заключается в следующем: к аликвоте плазмы крови объемом 0,5 мл добавляют 0,2 мл 10 % раствора мочевины в ДМСО, перемешивают на вортекс-миксере в течение 1–2 мин. Затем прибавляют 0,8 мл метанола и после интенсивного перемешивания в течение 1 мин центрифугируют 10 мин при 10 000 g. Полученный супернатант пропускают через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и используют для хроматографического анализа.

Согласно данным литературы, для экстракции тетрапиррольных соединений, в частности хлоринов, из биологических жидкостей и тканей используются различные, зачастую весьма трудоемкие, подходы [9–14]. Так, в работе [9] для экстракции хлорина еб из тканей различных внутренних органов животных использовали водные растворы тритона X-100. Процедура экстракции заключалась в следующем: 500 мг гомогенизированной ткани смешивали с 2 мл 0,5 % раствора тритона X-100, выдерживали 6 ч, центрифугировали и анализировали количественное содержание хлорина еб спектрофлуориметрическим методом по интенсивности флуоресценции раствора в области 660±5 нм. Ранее нами было показано, что использование водных растворов поверхностно-активного вещества тритон X-100 или смеси [метанол : тритон X-100 (1:4)] в качестве экстрагента для экстракции ФС Фотолон из печени крыс не позволяет обеспечить должную специфичность экстракции. На спектрах поглощения полученных экстрактов отсутствовали характеристические максимумы поглощения в области 662±5 нм [10]. Для экстракции хлорина еб в [11] использовали химический гидролиз тканей. С этой целью влажные кусочки тканей (массой 100 мг) помещали в 2 мл раствора, содержащего 1 М NaOH в 0,2 % растворе натрия додецилсульфата, и выдерживали в течение 7 дней до полного растворения. Количественное определение хлорина еб в полученных экстрактах осуществляли спектрофлуориметрически [11]. На наш взгляд, описанная процедура экстракции хлорина еб из биологических тканей является достаточно длительной, что существенно повышает трудоемкость фармакокинетического эксперимента.

В работе [12] описана методика выделения ряда производных хлорофилла *a* из плазмы крови больных, принимавших участие в клинических испытаниях хлорофиллина (препарат содержит 31 % медного комплекса хлорина еб, 33 % медного комплекса хлорина е4 и 4 % медного комплекса этилового эфира хлорина еб), заключающаяся в подкислении аликвоты плазмы (100 мкл) 0,1 М фосфатным буферным раствором (рН 5,0) и последующей жидкостной экстракции ледяной смесью метанол/хлороформ (600 мкл, 1:1). Данная методика представляется весьма трудоемкой и требует определенных навыков работы персонала с высоколетучими органическими соединениями, такими как хлороформ. В доступной литературе имеются примеры использования твердофазной экстракции тетрапиррольных соединений (порфиринов, хлоринов) на картриджах Sep-Pak C18 [13, 14]. Использование методов твердофазной экстракции позволяет осуществлять выделение исследуемых ФС из биологических жидкостей и тканей с достаточно высокой степенью извлечения, что является несомненным преимуществом данного подхода. Однако метод твердофазной экстракции также сопряжен со значительными материальными затратами на приобретение расходных материалов и соответствующего оборудования. Это в определенной мере ограничивает его применение, особенно для анализа большого количества образцов биологического материала.

Разработанная в ходе настоящего исследования методика экстракции ФС Фотолон из плазмы крови представляется простой и воспроизводимой. Нами были подобраны и экспериментально обоснованы соответствующие экстрагенты, а также условия проведения экстракции.

В следующей серии опытов изучались такие характеристики разработанной методики экстракции и последующего анализа количественного содержания ФС Фотолон в экстракте методом ВЭЖХ, как специфичность, воспроизводимость, степень извлечения, линейность, точность, пределы количест-

венного определения и обнаружения исследуемого ФС в заданных условиях эксперимента, стабильность экстрактов при хранении.

Специфичность методики. Хроматографический анализ «холостого» образца плазмы крови, не содержащего исследуемый ФС и подвергнутого процедуре жидкостной экстракции по описанной методике, позволил установить, что за исключением возмущения базовой линии в районе неудерживаемого объема в заданных условиях проведения хроматографического анализа элюируется только одно соединение со временем удерживания около $6,0 \pm 0,2$ мин. Наличие полосы поглощения в области 407 нм позволило предположить о том, что данное соединение является одним из эндогенных порфиринов. На хроматограммах экстрактов, полученных из образцов плазмы крови с известным содержанием ФС Фотолон, присутствовал пик со временем удерживания $7,51 \pm 0,12$ мин, что соответствовало времени удерживания хлорина еб на хроматограмме стандартного раствора в заданных условиях хроматографического разделения. Площадь пика, соответствующего хлорину еб, составляла 95,4 % от суммы всех компонентов. Кроме основного пика хлорина еб в использованных условиях анализа на хроматограммах было обнаружено несколько других пиков, по всей видимости относящихся к компонентам плазмы крови и собственным примесным соединениям в составе лекарственного средства Фотолон. Детектированные посторонние пики были разделены с основным пиком хлорина еб путем подбора соответствующих условий проведения хроматографического анализа (табл. 5). При наибольшем содержании ФС Фотолон (хлорина еб) в анализируемом образце наименьшее (критическое) разрешение (равно 1,8) наблюдается между пиком хлорина еб и примесным соединением, которое также было обнаружено на хроматограммах растворов ФС Фотолон в метаноле. Определение подлинности этих компонентов в верхнем концентрационном диапазоне не представляло сложности ввиду более чем 100-кратного превышения размера пика хлорина еб. При снижении концентрации хлорина еб в образцах плазмы крови до 1,5 мкг/мл и менее разрешение между пиком хлорина еб и пиком ближайшего по времени элюирования соединения возрастало до 5,2 (по всей видимости вследствие того, что концентрация собственной примеси образца ФС Фотолон уменьшается до значений, существенно меньших, чем предел обнаружения исследуемого ФС). Дополнительно для подтверждения подлинности пика, соответствующего хлорину еб, нами было рассчитано время его удерживания относительно времени удерживания пика эндогенного компонента плазмы крови (внутренний стандарт). При небольшом варьировании времени удерживания хлорина еб ($7,6 \div 8,1$ мин) относительное удерживание хлорина еб по отношению к эндогенному компоненту оставалось постоянным и составляло $1,21 \div 1,22$ (табл. 6).

Таблица 5

Рассчитанные значения эффективности (для изократического режима), асимметрии пика хлорина еб и разрешения пика хлорина еб (по отношению к ближайшему пику)

Концентрация хлорина еб в плазме, мкг/мл	Время удерживания хлорина еб, мин	Эффективность пика хлорина еб, число теоретических тарелок	Относительное удерживание хлорина еб / эндогенный порфирин	Разрешение (с ближайшим пиком)	Асимметрия пика хлорина еб
15,860	7,63	30 725	1,22	1,8	1,28
1,586	7,40	31 600	1,21	5,2	1,28
0,159	7,51	37 200	1,21	5,2	1,07

Линейность. Линейность отклика детектора оценивалась путем анализа рабочих стандартных образцов в диапазоне концентраций $0,016 \div 6,600$ мкг/мл, который был установлен нами в ходе предварительных пилотных экспериментов на кролях породы Шиншилла и соответствует диапазону возможных концентраций ФС Фотолон в крови экспериментальных животных после однократного внутривенного введения в дозе 5 мг/кг. Зависимость площади пика хлорина еб (S) от его концентрации (C) описывалась путем регрессионного анализа. Наилучшие результаты получены при описании анализируемой зависимости по биномиальному закону (рис. 1 а). Уравнение регрессионной кривой при этом имело вид: $C = 0,01731 + 2,29 \cdot 10^{-6} \cdot S - 5,89 \cdot 10^{-14} \cdot S^2$. Коэффициент линейной регрессии для биномиальной зависимости составил 0,99. Описание зависимости аналитического сигнала от концентрации уравнением линейной регрессии имело большую погрешность (даже в случае использования более узкого диапазона концентраций), особенно в области низкого содержания хлорина еб, из-за большого диапазона определяемых концентраций (рис. 1 б). Уравнение линейной зависимости имело вид: $C = 0,04179 + 2,10 \cdot 10^{-6} \cdot S$. Коэффициент регрессии для линейной зависимости равнялся 0,99 (при $C_{\max} - 1,6$ мкг/мл). Таким образом, использование уравнения линейной регрессии при по-

строении калибровочной кривой может быть оправданным только при условии разбавления концентрированных растворов и соответственно сужении динамического диапазона. Разработанная методика хроматографического анализа экстрактов хлорина еб из плазмы крови линейна в диапазоне концентраций 0,15÷15,5 мкг/мл.

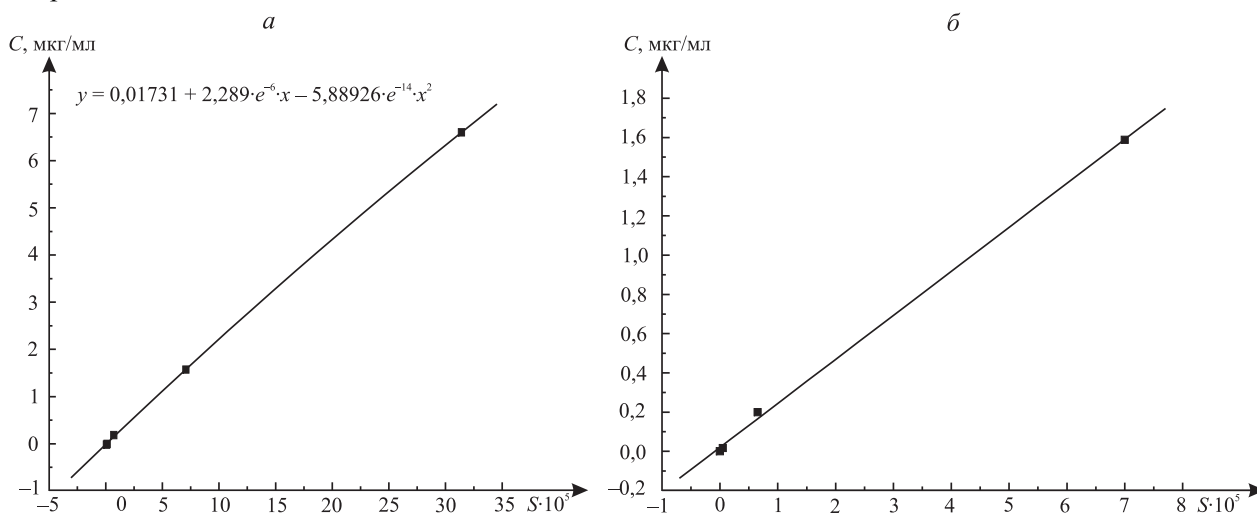


Рис. 1. Биномиальная (а) и линейная (б) зависимость площади пика хлорина еб от его концентрации в анализируемом экстракте

Степень экстракции. Концентрацию анализируемых образцов плазмы, содержащих известную долю хлорина еб, определяли на основе рассчитанной биномиальной зависимости $S = f(C)$ по следующей формуле:

$$C_{\text{ан}} = (0,01731 + 2,29 \cdot 10^{-6} \cdot S_{\text{ан}} - 5,89 \cdot 10^{-14} \cdot S_{\text{ан}}^2) \cdot 3,$$

где $S_{\text{ан}}$ – площадь пика хлорина еб в извлечении, 3 – коэффициент, учитывающий разбавление плазмы экстрагентом.

Степень экстракции хлорина еб из плазмы рассчитывали по формуле

$$X = \frac{C_{\text{ан}}}{C_{\text{доб}}},$$

где $C_{\text{ан}}$ – определенная хроматографически концентрация хлорина еб, $C_{\text{доб}}$ – заданная в плазму концентрация хлорина еб.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень экстракции препарата варьирует от 80,65 до 90,03 % (табл. 6). Полнота экстракции увеличивается при уменьшении концентрации хлорина еб в плазме (в диапазоне 0,1÷15,5 мкг/мл). Средняя степень экстракции соединения составила 85,0 %.

Таблица 6

Полнота извлечения хлорина еб при различных уровнях содержания ФС Фотолон в исследуемых образцах

Номер образца	Приготовленная концентрация, мкг/мл	Рассчитанная концентрация, мкг/мл	Средняя концентрация в экстракте, мкг/мл	Полнота экстракции, %	Средняя полнота экстракции, %
1.1	15,860	12,70	12,79	80,1	80,65
1.2	15,860	12,58		79,3	
1.3	15,860	13,07		82,4	
1.4	15,860	12,81		80,8	
2.1	1,586	1,335	1,336	84,2	84,27
2.2	1,586	1,321		83,3	
2.3	1,586	1,351		85,2	
2.4	1,586	1,338		84,4	
3.1	0,159	0,141	0,143	88,9	90,03
3.2	0,159	0,142		89,6	
3.3	0,159	0,145		91,1	
3.4	0,159	0,144		90,5	

Воспроизводимость. Относительное стандартное отклонение для определенного уровня содержания хлорина еб находилось в пределах от 1,1 до 4,2 % в зависимости от концентрационного уровня

содержания ФС Фотолон в образцах плазмы (табл. 7). При наименьшем содержании хлорина еб в плазме крови вариабельность результатов количественного определения оказалась также наименьшей.

Таблица 7

Воспроизводимость и точность методики при различных уровнях содержания ФС Фотолон в плазме крови

Уровень	Приготовленная концентрация, мкг/мл	Воспроизводимость, %	Точность, %
1	15,860	3,8	92,64
2	1,586	4,2	97,27
3	0,159	1,1	110,09

Точность. Точность P (%) определения хлорина еб в плазме крови рассчитывалась по формуле

$$P = \frac{(0,01731 + 2,29 \cdot 10^{-6} \cdot S_{\text{ан}} - 5,89 \cdot 10^{-14} \cdot S_{\text{ан}}^2) \cdot 3}{\bar{X} \cdot C_{\text{доб}}},$$

где $S_{\text{ан}}$ – площадь пика хлорина еб в извлечении, 3 – коэффициент, учитывающий разбавление плазмы экстрагентом, $\bar{X}$ – средняя степень извлечения хлорина еб из плазмы, $C_{\text{доб}}$ – заданная в сыворотку концентрация хлорина еб.

Полученные данные свидетельствуют об удовлетворительной точности методики. Определенное хроматографически отклонение содержания хлорина еб в плазме от заданного (принято за 100 %) не превышает 10 % для всего изучаемого концентрационного диапазона.

Пределы обнаружения хлорина еб. Уравнение линейной регрессии, представляющее собой зависимость площади хроматографического пика от концентрации препарата, имеет вид $C = 47,602S$ (кривая регрессии проходит через точку (0,0)). Предел обнаружения хлорина еб был рассчитан по полученному уравнению с учетом того, что шум базовой линии составлял 0,00005 В. Предел обнаружения хлорина еб в плазме крови в заданных условиях хроматографического анализа равнялся 0,007 мкг/мл.

Стабильность растворов. Повторный анализ экстрактов, полученных из плазмы крови, через 24 ч после экстракции показал, что концентрация хлорина еб несколько уменьшилась (<5 %). Дополнительных пиков на этих хроматограммах экстрактов зафиксировано не было. Тем не менее изменение концентрации соединения свидетельствовало о необходимости проведения анализа свежеприготовленных экстрактов.

В результате проведенных исследований были разработаны и валидированы точная и воспроизводимая методика экстракции ФС Фотолон из плазмы крови и методика количественного определения исследуемого лекарственного средства в полученных экстрактах методом ВЭЖХ. В дальнейшем разработанные методики были использованы в серии экспериментов по изучению фармакокинетики препарата Фотолон и оценке его абсолютной биодоступности при различных способах введения в организм.

1. Petrov P.T., Trukhachova T.V., Isakau G.A. et al. // Acta Bio-Optica et Informatica Medica. 2004. Vol. 10. P. 6.
2. Istomin Yu.P., Kaplan M.A., Shliakhtsin S.V. et al. // Proceedings of SPIE. 2009. Vol. 7380-73806V-2.
3. Kaplan M., Borgul O., Zakurdyayeva I., Spichenkova I. // J. Photodiagn. Photodyn. Ther. 2008. Vol. 5. P. S9.
4. Ragulin Y.A., Kaplan M.A., Medvedev V.N. // J. Thoracic Oncology. 2007. Vol. 2 (8). P. S622.
5. Laptsevich T.P., Chalau V.N., Trukhachova T.V. // J. Photodiagn. Photodyn. Ther. 2008. Vol. 5. P. S6.
6. Marchanka L.N., Petrov P.T., Trukhacheva T.V. et al. // Abstracts of the 10-th World congress of the International Photodynamic Association. Munich, 2005. P. 127.
7. Fedulov A.S., Sakovich I.I., Shliakhtsin S.V., Trukhachova T.V. // J. Photodiagn. Photodyn. Ther. 2008. Vol. 5. P. 7 (19).
8. Jeromin L., Peszynski-Drews C., Lipinski M. // Acta Bioptic. Inform. Med. 2004. Vol. 10. P. 10.
9. Kostenich G.A., Zhuravkin I.N., Zhavrid E.A. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1994. Vol. 22. P. 211.
10. Shlyakhtin S.V., Trukhacheva T.V., Isakov G.A., Istomin Yu.P. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2010. Vol. 4 (2). P. 184.
11. Tawakol A., Castano A.P., Anatelli F. et al. // J. Biomed. Opt. 2006. Vol. 11. P. 021008.
12. Egner P.A., Stansbury K.H., Snyder E.P. et al. // Chem. Res. Toxic. 2000. Vol. 13. P. 900.
13. Kennedy S.W., Maslen A.L. // J. Chromatography. 1989. Vol. 493. P. 53.
14. Chan A.L., Juarez M., Allen R. et al. // J. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 2005. Vol. 21 (2). P. 72.
15. Isakau H.A., Trukhacheva T.V., Zhebentyaev A.I., Petrov P.T. // J. Biomed. Chromatogr. 2007. Vol. 21 (3). P. 318.

Поступила в редакцию 14.09.10.

Татьяна Викторовна Трухачева – кандидат технических наук, заместитель генерального директора по вопросам инновационного развития РУП «Белмедпрепараты».

Сергей Владимирович Шляхтин – начальник лаборатории фармакологии и токсикологии РУП «Белмедпрепараты».

Геннадий Александрович Исаков – научный сотрудник Gemin X Pharmaceuticals Inc. (Монреаль, Канада).

Игорь Викторович Семак – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии.