

УДК 543, 544.068,
615.22,
615.45, 547,
611-018.54

1 – ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмолловский, ст. Капитолово, корп. № 93

1 – Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency, build. 93, Kapitolo station, G/P Kuz'molovsky, Vsevolzskiy district, Leningrad Region, 188663, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: esavelieva59@mail.ru
Тел.: 8 (812) 449 61 77 доб. 240

Эффективность и безопасность лекарственных средств

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛЬДОНИЯ, ГАММА-БУТИРОБЕТАИНА И КАРНИТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

П.Н. Сорокоумов¹, Е.И. Савельева^{1*}, Г.В. Каракашев¹, В.А. Копейкин¹, А.С. Радилев¹

Резюме. Предложена методика количественного определения в рамках одной процедуры мельдония, L-карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. В качестве внутреннего стандарта использовали изотопно-меченый d9L-карнитин. Предложен алгоритм построения градуировочных зависимостей при количественном определении содержания в плазме эндогенных соединений (L-карнитина и гамма-бутиробетаина). Методика валидирована в диапазоне концентраций от 0,05 до 20 мкг/мл для трех аналитов и применена для фармакометаболического исследования плазмы крови при курсовом приеме мельдония как монопрепарата и в комплексе с L-карнитином.

Ключевые слова: мельдоний, L-карнитин, гамма-бутиробетаин, ВЭЖХ-МС, фармакометаболика.

DETERMINATION OF MELDONIUM, γ -BUTYROBETAINE, AND CARNITINE IN BLOOD PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS-SELECTIVE DETECTION

P.N. Sorokoumov¹, E.I. Savelieva^{1*}, G.V. Karakashev¹, V.A. Kopeikin¹, A.S. Radilov¹

Abstract. A procedure for simultaneous quantitative determination of meldonium, L-carnitine, and γ -butyrobetaine in blood plasma by high-performance liquid chromatography with mass-selective detection and the isotopically labeled d9L-carnitine as internal standard is proposed. An algorithm for constructing calibration plots for the quantitation of biogenic plasma components (L-carnitine, and γ -butyrobetaine) is developed. The procedure is validated for the concentration range from 0,05 to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ and applied in a pharmacometabolomic study of blood plasma on protracted administration of meldonium as a monopreparation and as a complex with L-carnitine.

Keywords: medonium, L-carnitine, γ -butyrobetaine, HPLC–MS, pharmacometabolomics.

ВВЕДЕНИЕ

Мельдоний (3-(2,2,2-триметилгидразин)пропионат-ТНР) был синтезирован И. Калвиншем (I. Kalvinsh) в Институте органического синтеза в Латвии и первое применение нашел в качестве противоишемического средства [1]. В настоящее время мельдоний широко применяется в клинической практике при лечении ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, абстинентного алкогольного синдрома, острых на-

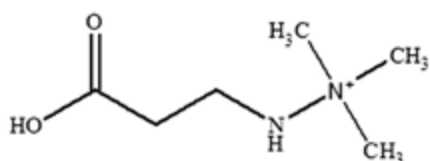
рушений мозгового кровообращения [2, 3]. Метаболические последствия приема мельдония разнообразны и до настоящего времени исчерпывающим образом не изучены. При этом доказано, что к безусловным биологическим эффектам мельдония относится блокирование биосинтеза карнитина, его транспорта в ткани и реабсорбции почками [4]. Установлено также [5], что снижение содержания карнитина в тканях и плазме крови приводит к повышению уровня биопредшественника карнитина – гамма-бутиробетаина (рисунок 1).



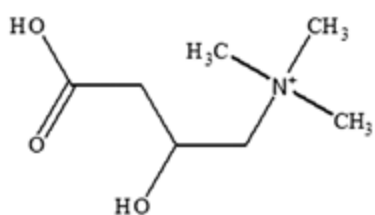
Рисунок 1. Механизм действия и биологические эффекты мельдония

В последние годы были получены данные о новых метаболических эффектах мельдония [6]. Современный уровень развития аналитической техники позволяет в рамках одной процедуры проводить мониторинг индивидуальной фармакотоксикокинетики ксенобиотика и концентраций биогенных веществ, вовлеченных в реализацию биологических эффектов от воздействия этого ксенобиотика. Исследование метаболических последствий воздействия лекарственных средств на организм человека в настоящее время рассматривается как самостоятельное направление биоаналитических исследований, именуемое фармакометаболизмом [7, 8]. Поскольку фармакологические эффекты мельдония реализуются опосредованно, в рамках терапевтического мониторинга необходимо контролировать содержание в плазме крови не только мельдония, но также L-карнитина (далее карнитина) и гамма-бутиробетаина. Три перечисленных соединения не только метаболически взаимосвязаны, но и родственны по структуре (рисунок 2), близки по физико-химическим свойствам (таблица 1), поэтому могут быть определены в рамках одной аналитической процедуры с применением единого внутреннего стандарта.

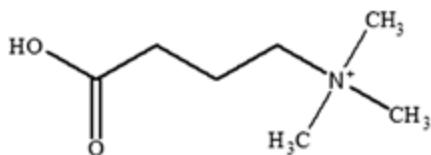
В литературе есть лишь отдельные примеры совместного определения в биожидкостях соединений,



3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионата дигидрат
(Мельдоний)



(3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбутаноат
(Карнитин)



4-триметиламмонийбутаноат
(Гамма-бутиробетаин)

Рисунок 2. Структурные формулы мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина

представленных в таблице 1. Так, результаты совместного определения концентраций мельдония и гамма-бутиробетаина в биологических пробах приведены в работе [10]. Карнитин, как правило, определяют в биожидкостях в совокупности с ацилкарнитинами [11] в целях диагностики врожденных метаболических нарушений. Мельдоний, карнитин и гамма-бутиробетаин являются нелетучими соединениями, поэтому в качестве метода разделения при их определении используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), причем, как правило, с масс-спектрометрическим детектированием. Последнее обстоятельство обусловлено отсутствием у них селективного максимума поглощения в ультрафиолетовой области, с одной стороны, и возможностью эффективной ионизации молекул электрораспылением, с другой стороны. При этом в доступных литературных источниках удалось обнаружить единственный пример совместного определения этих трех веществ в плазме крови. Методика совместного определения мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в биологических образцах в общем виде представлена в работе [12]. В более поздних публикациях [4, 5] никаких дополнительных сведений аналитического характера не приводится, авторы ограничиваются ссылкой на уже упомянутую статью, содержащую лишь конспективное изложение методики, основанной на применении ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Метод ВЭЖХ-МС/МС, безусловно, является оптимальным выбором при проведении фармакокинетических и фармакометаболических исследований, а также терапевтического лекарственного мониторинга, поскольку обеспечивает высочайшую чувствительность и селективность определения аналитов в сложных матрицах при минимальной пробоподготовке «dilute and shoot» («разбавить и инжестировать») [13–15]. В то же время приборы для ВЭЖХ-МС/МС-анализа дороги и пока доступны не для всех российских лабораторий.

Таблица 1.

Физико-химические характеристики аналитов [9]

Вещество	Брутто-формула	Молекулярная масса. а.е.м.	LogP	pKa
Мельдоний	C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂	147,113	-2,6	3,5
Гамма-бутиробетаин	C ₇ H ₁₆ NO ₂	146,118	-4,0	4,5
Карнитин	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161,105	-4,9	4,2

В работе [16] была предложена процедура количественного определения мельдония в биологических жидкостях более простым и доступным методом

ВЭЖХ-МС. Причем применение гораздо менее селективного в сравнении с ВЭЖХ-МС/МС метода не потребовало более сложной процедуры подготовки проб к анализу. Последнее важно, поскольку сложные процедуры разделения и концентрирования не только увеличивают затраты труда, реактивов и времени, но также зачастую приводят к искажению состава анализируемой пробы [15]. В то же время переход от индивидуального определения мельдония в биопробах к одновременному определению трех аналитов требует существенной модернизации методики. Основная трудность заключается в том, что карнитин и гамма-бутиробетаин являются эндогенными веществами, причем фоновые уровни их содержания в плазме крови варьируются в достаточно широких пределах [12].

В рамках настоящего исследования нами разработана ВЭЖХ-МС-методика количественного определения мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови, проведена валидация разработанной методики с использованием биообразцов, содержащих искусственные добавки аналитов, и ее апробация в биоаналитических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы, градуировочные растворы

- Мельдоний (милдронат, раствор для инъекций 500 мг/5 мл производства ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия, серия 971212, срок годности до 12.2016). [Выбор данного аптечного препарата обусловлен его доступностью, в т.ч. ценовой. Характеристики указанного продукта не влияют на качество валидации и результаты апробации методик.];
- Милдроната дигидрат [Sigma Aldrich, CAS 86426-17-71; $\geq 98\%$ (HPLC)] использовали для контроля пригодности раствора для инъекций в качестве стандартного образца;
- L-карнитина гидрохлорид (Sigma Aldrich, CAS 6645-46-1);
- Стандарт гамма-бутиробетаина с содержанием основного вещества не менее 95% синтезирован в НИИ экспериментальной медицины;
- В качестве внутреннего стандарта использовали d9 (3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбутаноат (Sigma Aldrich, CAS 1219386-75-0);
- Муравьиная кислота производства компании Sigma, кат. № 251364, США;
- Ацетонитрил для хроматографии фирмы «Криохром», сорт 4;
- Метанол для ВЭЖХ производства компании Merck, кат. № 1.06018.2500, Германия.

Для получения модельных проб плазмы крови с добавками аналитов использована объединенная плазма крови от десяти здоровых доноров.

Исходную смесь (ИС) определяемых веществ с концентрацией каждого компонента 2 мг/см^3 готовили в мерной колбе вместимостью 100 см^3 , внося в колбу рассчитанный объем аптечного препарата мельдоний в виде раствора для инъекций и рассчитанные массы навесок гидрохлоридов гамма-бутиробетаина и карнитина с последующим доведением содержимого колбы деионизированной водой до метки. Рабочие растворы с концентрацией определяемых веществ 0,005; 0,020; 0,075; 0,25; $1,00 \text{ мг/см}^3$ готовили путем разбавления ИС водой.

Для получения градуировочных характеристик готовили 6 градуировочных смесей (ГС), используя в качестве матрицы бланковую плазму крови. На всех этапах валидационных испытаний методики использовали аликвотные части одной и той же бланковой плазмы. В виалы вместимостью 2 см^3 , содержащие по 1 см^3 бланковой плазмы крови, вносили по $0,01 \text{ см}^3$ приготовленных смесей с концентрациями компонентов 0,005; 0,020; 0,075; 0,25; 1,00 и $2,00 \text{ мг/см}^3$. Внесенные в виалы массы определяемых компонентов составили 0,05; 0,2; 0,75; 2,5; 10 и 20 мкг. Содержимое виал перемешивали с помощью шейкера. Затем из виал отбирали по $0,2 \text{ см}^3$ смесей и переносили в пробирки Eppendorf вместимостью $2,0 \text{ см}^3$, в которые с помощью механических дозаторов вносили по $0,01 \text{ см}^3$ раствора дейтерированного внутреннего стандарта d9 (3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбутаноата с концентрацией $0,20 \text{ мг/см}^3$ и по $1,0 \text{ см}^3$ метанола. Полученные смеси центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин. Надосадочные слои переносили в хроматографические виалы вместимостью 2 см^3 , которые устанавливали в автодозатор хроматографа. Для каждой ГС было приготовлено по 3 параллельных пробы.

Для определения метрологических характеристик готовили по такой же процедуре рабочие смеси (РС) и контрольные смеси (КС), внося в 1 см^3 бланковой плазмы крови по 0,2 и 5 мкг определяемых веществ. Погрешность приготовления составила 3,5%.

Параллельно готовили холостую пробу, добавляя к $0,2 \text{ см}^3$ бланковой плазмы крови $0,01 \text{ см}^3$ раствора дейтерированного внутреннего стандарта d9-карнитина и $1,0 \text{ см}^3$ метанола и отбирая затем надосадочный слой после центрифугирования смеси.

Условия ВЭЖХ-МС-анализа

Использовали хроматограф жидкостный Shimadzu LC-20, оснащенный масс-селективным детектором Shimadzu LCMS-2010 EV с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении, программным обеспечением для управления и обработки дан-

ных LCMS Real Time Analysis и хроматографической колонкой Supelcosil LC-NH2 (Supelco) длиной 150 мм, диаметром 3,00 мм, с размером частиц сорбента 3,0 мкм.

- Подвижная фаза: компонент А – 0,01% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде; компонент В – ацетонитрил.
- Режим хроматографического элюирования – изократический.
- Соотношение компонентов подвижной фазы А:В – 1:9.
- Скорость потока элюента – 0,3 см³/мин.
- Температура термостата колонки – 35 °С.
- Температура термостата – 20 °С.
- Объем вводимой пробы – 0,005 см³.
- Время анализа – 13 мин.

Условия работы масс-спектрометрического детектора

Масс-спектрометрический детектор – Shimadzu LCMS-2010 EV:

- Скорость потока газа-осушителя – 1,5 дм³/мин;
- Давление на распылителе – 0,1 МПа;
- Температура газа-осушителя – 290 °С;
- Температура вспомогательного потока – 300 °С;
- Детектирование в режиме регистрации избранных (таблица 2), положительно заряженных ионов, полученных при ионизации электрораспылением при атмосферном давлении.

Таблица 2.

Времена удерживания определяемых веществ и массовые числа характеристичных ионов в их масс-спектрах

№ п/п	Времена удерживания соединения, мин	Соединение	m/z
1	4,6	Мельдоний	147
2	5,9	Карнитин	162
3		d9-карнитин	171
4	4,5	Гамма-бутиробетаин	146

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методика была валидирована с использованием плазмы крови, содержащей искусственные добавки аналитических стандартов определяемых веществ. Были определены в соответствии с РМГ61-2010 [21] линейный диапазон, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность и оценена относительная погрешность результата анализа.

Способ построения градуировочных характеристик

При разработке методик количественного определения содержания микрокомпонентов в сложных смесях в качестве градуировочных обычно используют растворы аналитов в наиболее подходящем растворителе. Тогда при обработке результатов измерений учитывается коэффициент извлечения аналитов из матрицы. Как правило, величина коэффициента извлечения считается неизменной в пределах всего линейного диапазона измерений. Лишь в отдельных методиках [17] вводятся поправочные множители, учитывающие менее эффективное извлечение аналитов из матриц в области низких концентраций. Кроме того, влияние на результаты измерений соэкстрагируемых с аналитами компонентов матрицы не учитывается вовсе, поскольку градуировочные растворы этих компонентов не содержат. Многолетний опыт исследования биологических проб в нашей лаборатории показал, что при приготовлении градуировочных растворов с использованием той же биологической среды, которая является объектом анализа, удается получить более удовлетворительные метрологические характеристики методики, поскольку градуировочные образцы и анализируемые пробы идентичны по матричному составу и претерпевают одинаковые процедуры в ходе подготовки к анализу и его проведения. Такой подход хорошо зарекомендовал себя при разработке методик определения ксенобиотиков и их метаболитов в биологических жидкостях [18–20]. Для определения концентраций эндогенных компонентов плазмы крови – карнитина и гамма-бутиробетаина – был разработан новый способ построения градуировочных характеристик.

Если матрица, используемая для приготовления градуировочных образцов, изначально содержит определяемое вещество с неизвестной концентрацией, то значения концентраций в градуировочных образцах после внесения известного количества определяемого вещества неизвестны. В этом случае с учетом линейной зависимости площади пика от концентрации аналита возможны два варианта построения градуировочной характеристики.

В первом варианте для каждого градуировочного образца откладываются экспериментальные точки со следующими координатами: величина измеренной площади аналита и введенная концентрация аналита. Получается график, не проходящий через начало координат, пересекающий ось ординат при значении Q₀ и смещенный влево по оси абсцисс на величину концентрации аналита в матрице (C₀).

Мы следовали второму варианту, при котором для построения градуировочной характеристики использовали дополнительную экспериментальную точку – величину площади пика аналита (Q₀) для холостой пробы, то есть отклик измерительной системы в виде

площади пика Q_0 на величину концентрации определяемого вещества (C_0) в матрице. В этом случае уравнение зависимости площади пика от концентрации (1) записывается в виде:

$$Q = K \cdot (C_0 + C_{\text{введ}}) = Q_0 + K \cdot C_{\text{введ}}, \quad (1)$$

где Q – измеряемая величина площади пика аналита; $C_{\text{введ}}$ – концентрация аналита, введенного в матрицу при приготовлении градуировочных образцов.

Если (1) представить в эквивалентном виде $Q - Q_0 = K \cdot C_{\text{введ}}$, то для измеряемой площади пика аналита в градуировочной пробе за вычетом площади пика аналита в холостой пробе получим линейную зависимость от концентрации аналита, введенного в градуировочный образец. Градуировочная характеристика проходит через начало координат, коэффициент чувствительности (K) определяется по методу наименьших квадратов, а концентрация аналита в исходной матрице рассчитывается по формуле:

$$C_0 = Q_0 / K. \quad (2)$$

Для расчета градуировочных характеристик предварительно проводили измерения площадей пиков аналитов в плазме крови, используемой для приготовления градуировочных образцов. Статистические расчеты проводили по установленным значениям концентраций аналитов в плазме за вычетом содержания аналитов в бланковой плазме крови.

Коэффициент детерминации (R^2) для всех трех градуировочных характеристик составляет 0,999 (рисунок 3), что свидетельствует о правомерности использования линейных градуировочных характеристик в диапазоне концентраций аналитов в плазме крови от 0,05 до 20 мкг/см³.

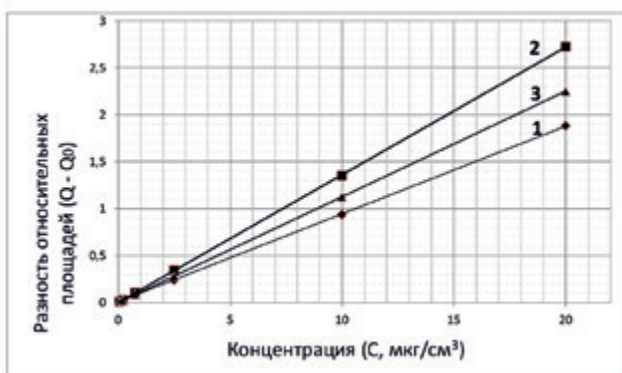


Рисунок 3. Градуировочные характеристики мельдония (1), гамма-бутиробетаина (2) и карнитина (3)

Метрологические характеристики методики

Селективность методики подтверждали методом стандартной добавки. Исследование повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методи-

ки проводили в соответствии со стандартным протоколом [21]. Рассчитанные значения СКО повторяемости находятся в диапазоне от 4,0% до 7,9%. Значения t -статистики Фишера и Стьюдента, рассчитанные по результатам, полученным двумя аналитиками, составили 1,52 и 1,59 (мельдоний), 1,11 и 1,64 (гамма-бутиробетаин), 1,30 и 0,10 (карнитин) и не превышали критических (табличных) показателей.

Суммарную погрешность результата измерения концентрации ($\pm \Delta C$, %) оценивали для доверительной вероятности $P=0,95$, учитывая погрешность повторяемости результатов ($\Delta_{\text{повт}}$) при числе измерений $n=6$, погрешность градуировочной характеристики ($\Delta_{\text{гр}}$) и погрешность приготовления испытательных смесей ($\Delta_{\text{смеси}}$). Величины суммарной погрешности и ее составляющих представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Значения погрешности и ее составляющих

Параметр	Мельдоний		Гамма-бутиробетаин		Карнитин	
	до 0,75 мкг/см ³	от 0,75 до 10 мкг/см ³	до 0,75 мкг/см ³	от 0,75 до 10 мкг/см ³	до 0,75 мкг/см ³	от 0,75 до 20 мкг/см ³
$\Delta_{\text{повт}}$, %	7,9	5,5	5,3	5,1	–*	4,5
$\Delta_{\text{гр}}$, % **	13	6	11	8	–	8
$\Delta_{\text{смеси}}$, %	3,5	3,5	3,5	3,5	–	3,5
ΔC , %	16	9	13	10	–	9

Примечание: * – фоновая концентрация аналита в плазме крови выше пограничного критерия;

** – приведено максимальное значение в поддиапазоне.

Результат измерения концентрации в тестовой пробе (C) представляется в виде:

$$C = C_{\text{ср}} \cdot (1 \pm \Delta C / 100),$$

где $C_{\text{ср}}$ – среднее значение концентрации по результатам измерений; ΔC – суммарная погрешность при доверительной вероятности $P=0,95$ (таблица 3), выраженная в процентах.

Для оценки правильности измерений использовали рабочие смеси (РС), приготовленные введением в бланковую плазму крови определяемых веществ на уровне 0,2 мкг/см³ (РС1) и 5 мкг/см³ (РС2). Правильность результатов измерений оценивали по факту по-

падения значений концентраций, рассчитанных на основании градуировочных характеристик, в интервал допускаемых значений, определяемый суммарной погрешностью в точке измерения (таблица 4).

Таблица 4.

Значения измеренных концентраций и диапазоны допускаемых значений

Параметр	Мельдоний		Гамма-бутиробетаин		Карнитин	
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
Заданное значение концентрации, мкг/см ³	0,20	5,00	0,20	5,00	–*	5,00
Значение концентрации, рассчитанное по градуировочной зависимости, мкг/см ³	0,21; 0,19	4,80; 4,90	0,19; 0,21	5,10; 4,90	–	5,12; 5,10
Диапазон допускаемых концентраций в соответствии с погрешностью в точке измерения, мкг/см ³	0,17- 0,23	4,5- 5,5	0,17- 0,23	4,5- 5,5	–	4,5- 5,5

Примечание: * – добавка не определяется ввиду высоких значений фоновых концентраций.

Результаты апробации методики в биоаналитическом эксперименте

Разработанная методика была использована для определения массовых концентраций мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина в пробах плазмы крови, полученных в ходе клинических исследований. В ходе эксперимента были измерены фоновые уровни концентраций карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови 12 здоровых добровольцев, определены вариации концентрации карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови в течение дня.

Пробы крови объемом не менее 5 см³ отбирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Сразу после отбора пробу крови центрифугировали при скорости вращения ротора 3500 об/мин в течение 15 мин для получения плазмы крови. В центрифужную пробирку вместимостью 2,0 см³ вносили 0,2 см³ плазмы крови, 0,01 см³ раствора внутреннего стандарта с концентрацией 0,2 мг/см³ и 1,0 см³ метанола. Смесь центрифугирова-

ли в течение 10 мин при 14000 об/мин. Надосадочный слой переносили в хроматографическую вialsу вместимостью 2 см³. Аналогичную процедуру проводили параллельно и для холостого образца плазмы крови. Аликвотные части проб объемом 0,005 см³ анализировали методом ВЭЖХ-МС. По значениям площадей хроматографических пиков с использованием градуировочных характеристик и программы обработки данных находили концентрации аналитов в плазме крови. В рамках отдельных экспериментов было установлено, что хранение плазмы в холодильнике (+4 °С) в течение суток или в морозильной камере (–20 °С) в течение месяца не оказывает влияния на результаты анализа. Получены фармакокинетические кривые мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина в течение курсового приёма мельдония как монопрепарата (группа М) и мельдония в сочетании с карнитином (группа М+К) (таблица 5).

На рисунке 4 представлена масс-хроматограмма экстракта плазмы крови добровольца через 2 ч после приёма мельдония в дозе 500 мг, реконструированная по ионам с массовыми числами m/z 146, 147, 162 и 171.

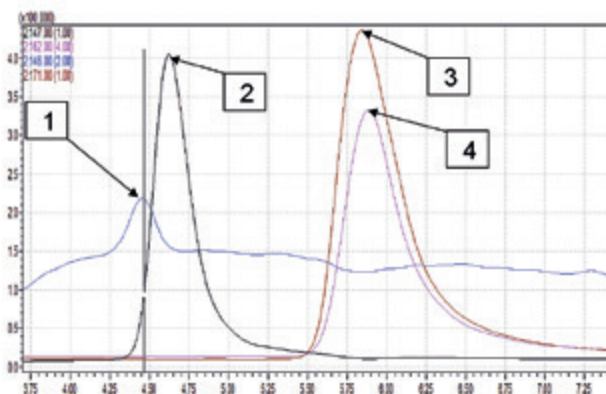


Рисунок 4. Хроматограмма экстракта плазмы крови добровольца через 2 ч после приёма мельдония; 1 – гамма-бутиробетаин, 2 – мельдоний, 3 – d9-карнитин, 4 – карнитин

На основании измеренных массовых концентраций были рассчитаны фармакокинетические параметры мельдония для добровольцев, принимавших мельдоний как монопрепарат и мельдоний в сочетании с карнитином, построены фармакокинетические кривые (рисунок 5), а также определены закономерности в изменении концентраций карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови в течение курсового приёма препаратов в обеих группах добровольцев.

Как видно из рисунка 5, в целом фармакокинетические кривые мельдония для монопрепарата (М) и комплексного препарата (М+К) практически совпадают. Такой результат является неожиданным с учетом

Таблица 5.

Измеренные концентрации аналитов в плазме крови добровольцев, принимавших мельдоний (группа М) и мельдоний в сочетании с карнитином (группа М+К)

Параметр	Мельдоний		Гамма-бутиробетаин		Карнитин	
	М	М+К	М	М+К	М	М+К
Фоновое значение концентрации аналитов, мкг/см ³	–	–	0,30±0,05		7,45±0,21	
Диапазон фоновых значений концентрации аналитов, мкг/см ³	–	–	0,18–0,54		5,58–8,87	
Среднее значений концентрации аналитов при приёме препаратов в точке максимальной концентрации, мкг/см ³	9,58±0,97	9,31±0,67	0,34±0,02	0,53±0,04	9,78±0,66	11,77±1,56
Минимальное значение концентрации аналитов при приёме препаратов, мкг/см ³	–	0	0,18	0,21	5,96	6,66
Максимальное значение концентрации аналитов при приёме препаратов, мкг/см ³	11,98	12,5	0,40	0,71	11,69	19,35

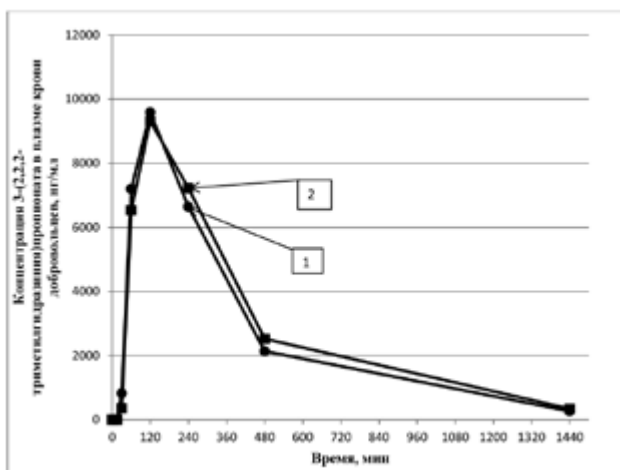


Рисунок 5. Фармакокинетические кривые мельдония для обеих групп добровольцев; 1- группа, принимавшая монопрепарат (М); 2 – группа, принимавшая комплексный препарат (М+К)

конкурентного фармакологического взаимодействия мельдония и карнитина. В то же время, как следует из таблицы 5, закономерным результатом явилось некоторое снижение концентрации карнитина в плазме крови после приема мельдония (группа М) и увеличение после приема комплексного препарата (М+К). При сравнении концентраций гамма-бутиробетаина

в плазме добровольцев в первый и последний дни испытаний можно заключить, что увеличение концентрации гамма-бутиробетаина в плазме отмечается только после приёма комплексного препарата (М+К), а в группе, принимавшей только мельдоний (М), не носило такого выраженного характера (таблица 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована в диапазоне концентраций от 0,05 до 20 мкг/см³ методика определения количественного содержания мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в плазме крови с использованием дейтерированного внутреннего стандарта d9-карнитина путем депротенинизации плазмы посредством разбавления метанолом и отделения осадка центрифугированием с последующим определением аналитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. Методика успешно использована для сравнительного исследования фармакокинетики мельдония как монопрепарата и в комплексе с карнитином, а также выявления изменений содержания гамма-бутиробетаина и карнитина в крови добровольцев, принимавших мельдоний в качестве монопрепарата и в комплексе с карнитином.

ЛИТЕРАТУРА

1. N. Sjakste, A. Gutcaits, I. Kalvinsh. Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications // *CNS Drug Rev.* 2005. № 11(2). P. 151–68.
2. Н.К. Мурашко. Возможности Мельдония в кардионеврологической практике // *Международ. неврол. журн.* 2012. № 4. С. 111–120.
3. Н.Ю. Семиголовский, С.Ю. Колбасов, Д.В. Лисицын, Фазылов. Повышение защитных свойств милдроната // *Вестник Санкт-Петербургского Университета.* Сер. 11. 2008. Прил. к вып. 1.
4. M. Makrecka et al. Mildronate, the inhibitor of l-carnitine transport, induces brain mitochondrial uncoupling and protects against anoxia-reoxygenation // *European Journal of Pharmacology.* 2014. V. 723. P. 55–61.
5. E. Liepinsh et al. Mildronate treatment alters γ -butyrobetaine and l-carnitine concentrations in healthy volunteers // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2011. № 63. P. 1195–1201.
6. M. Dambrova et al. Meldonium decreases the diet-increased plasma levels of trimethylamine N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis // *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2013. V. 53. Is. 10. P. 1095–1098.
7. R. Kaddurah-Daouk, B. Kristal, R.M. Weinshilboum. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2008. № 48. P. 653–683.
8. R. Kaddurah-Daouk, R. Weinshilboum. Pharmacometabolomics: Implications for Clinical Pharmacology and Systems Pharmacology // *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2014. № 95. P. 154–167.
9. Структурные формулы мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина. URL: <http://www.Chemicalize.org> // ChemAxon structure based predictions (дата обращения 15.12.2015).
10. F.M. Vaz et al. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry // *Clin. Chem.* 2002. № 48 (6 Pt 1). P. 826–34.
11. P.E. Minkler et al. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry // *Clin Chem.* 2008. № 4. V. 54(9). P. 1451–62.
12. M. Dambrova et al. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance // *Physiol Behav.* 2008. № 95. P. 341–347.
13. L.E. Edinboro, R.C. Backer, A. Poklis. Direct analysis of opiates in urine by liquid chromatography – tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2005. № 29. P. 704–710.
14. R. Dams, C.M. Murphy, W.E. Lambert, M.A. Huestis. Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 2003. № 17. P. 1665–1670.
15. R.L. Fitzgerald et al. Dilute and shoot: analysis of drugs of abuse using selected reaction monitoring for quantification and full scan product ion spectra for identification // *J Anal Toxicol.* 2012. № 36(2). P. 106–11.
16. Т.Е. Морозова и др. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-триметилгидразиний)-пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования (электроспрей) // *Аналитика и Контроль.* 2013. Т. 17. № 2. С. 28–36.
17. А.И. Уколов, Т.И. Орлова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов. Хроматомасс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием экстрактивного алкилирования // *Журнал аналитической химии.* 2015. Т. 70. № 9. С. 968–975.
18. Свидетельство об аттестации № 222.0183/01.00258/2012 от 02.08.2012. ФР.1.39.2012.13710. Методика измерений массовых концентраций О-алкилметилфосфонатов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием / Г.В. Каракашев, Н.В. Криворотова, Т.Е. Морозова, Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, В.А. Копейкин.
19. Свидетельство об аттестации № 222.0255/01.00258/2014 от 22.10.2014. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических веществ, реактивированных из состава аддуктов, в плазме крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии / Е.И. Савельева, Н.Л. Корягина, В.А. Копейкин, П.Н. Сорокоумов, В.Ю. Конева.
20. Свидетельство об аттестации № 222.0320/01.00258/2013 от 08.11.2013. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биологических пробах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / А.И. Уколов, Е.С. Уколова, Е.И. Савельева, П.Н. Сорокоумов, В.А. Копейкин.
21. РМГ61-2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – М.: Стандартинформ, 2012.