

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛОКСИКАМА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

Раменская Г.В., Мидруев Е.Ю.,
Медведев Ю.В., Комаров Т.Н.,
Шохин И.Е.

ГБОУ ВПО Первый
Московский государственный
медицинский университет им.
И.М. Сеченова Минздрава
России



Разработана методика определения нестероидного противовоспалительного средства мелоксикама в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Пробоподготовку проводили путем осаждения белков 50 % раствором трифторуксусной кислоты. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, и стабильность. Аналитический диапазон методики составил 40 – 2000 нг/мл. Разработанная методика позволяет проводить определение концентрации мелоксикама в крови добровольцев и может быть применена для фармакокинетических исследований.

Введение

Мелоксикам $\pm$ нестероидный противовоспалительный препарат из группы оксикамов, включенный в перечень ЖНВЛС. Мелоксикам представляет собой светло-желтое вещество, практически нерастворимое в воде, очень хорошо растворимое в сильных кислотах и щелочах, практически нерастворимое в метаноле. Кажущийся коэффициент распределения ($\log P$)_{app} составляет 0,1 в *n*-октанол/буфер pH 7,4, что говорит о его ионизации в нейтральных и слабощелочных средах. Значения pK_a мелоксикама составляют 1,1 и 4,2. Молекулярная масса - 351,41 г/моль. Структурная формула мелоксикама приведена на Рисунке 1 [1].

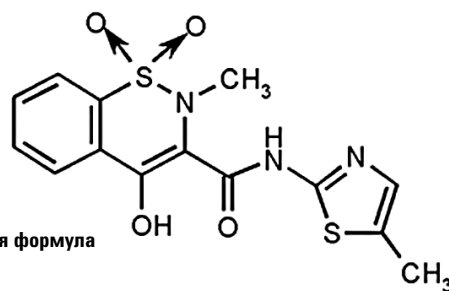


Рисунок 1. Структурная формула
мелоксикама



В последние годы при назначении пациентам с заболеваниями опорно-двигательного аппарата нестероидных противовоспалительных препаратов врачи все чаще отдают предпочтение селективным ингибиторам циклооксигеназы-2. Наибольшим числом торговых наименований в этой подгруппе в России представлено лекарственное средство мелоксикам, что облегчает провизору задачу синонимической замены в случае ее необходимости. В более чем 230 клинических исследованиях у больных остеоартрозом, ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом было доказано, что, не уступая традиционным (неселективным) НПВП по эффективности, мелоксикам в то же время обладает лучшим профилем безопасности. Так, не оказывая значимого воздействия на циклооксигеназу-1, мелоксикам не нарушает синтез гастропротекторных простагландинов, а потому значительно реже вызывает гастропатии по сравнению с неселективными нестероидными анальгетиками. Кроме этого, рассматриваемое ЛС характеризуется минимальным отрицательным влиянием на печень и, что особенно важно, не обладает деструктивным воздействием в отношении хондроцитов. Это, в частности, делает мелоксикам одним из средств выбора для симптоматического лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний хрящевой ткани [2]. Социальная значимость лекарственных средств мелоксикама определила тот факт, что он был включен в Перечень ЖНВЛП [3].

Цель данной работы заключалась в разработке и валидации методики определения мелоксикама в плазме крови человека, которая могла бы быть применима для фармакокинетических исследований. Среди опубликованных методов количественного определения мелоксикама в плазме крови приведены методы жидкостной хроматографии с УФ-детектором или диодно-матричным детектором [4, 5]; жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием [6, 7]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для сравнительных фармакокинетических исследований препаратов мелоксикама.

Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1290 градиентный насос	G4220A
1290 термостат колонок	G1316C
1290 автосамплер	G4226A
1290 диодно-матричный детектор	G4212A

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 150 x 4,6 мм 5 мкм
Предколонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5 x 4,6 мм 5 мкм
Температура колонки	30,3 °C
Подвижная фаза	50 mM фосфатный буфер pH 3,50 – ацетонитрил (55:45)
Скорость потока подвижной фазы	1 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл
Детектирование	длина волны 364±4 нм с записью спектра в диапазоне 220-400 нм
Время хроматографирования одной пробы	7 минут
Время удерживания мелоксикама	около 5,5 минут

Программное обеспечение

ChemStation (ver. A.01.04.122),
Agilent Technologies, США.

Растворы и реактивы

Мелоксикам, субстанция порошок; метанол (gradient grade, J.T. Baker, Голландия); ацетонитрил (gradient grade, Scharlau); натрия фосфат дигидрат (extra pure, Scharlau); фосфорная кислота концентрированная (х.ч.); кислота трифторуксусная (ч.д.а.); вода очищенная.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы крови (Pozis, MM-180/20/35,

Россия) при температуре от –35 °C до –40 °C. Стандартные растворы хранили в фармацевтическом холодильнике при температуре от 2 °C до 8 °C (Pozis, XF-250, Россия).

Исходный стандартный раствор мелоксикама готовили растворением навески в метаноле и хранили при температуре от 2 °C до 8 °C. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора мелоксикама водой очищенной.

Пробоподготовка

Для пробоподготовки применяли вортекс-шейкер Reax Top (Heidolph, Германия), центрифугу SL 16 (Thermo Scientific, США). Определение pH проводилось на портативном pH/мВ-метре pH 330i, (WTW, Германия). Взятие навесок осуществляли на весах аналитических электронных GR-200 (A&D, Япония). Дозирование плазмы по объему осуществляли при помощи дозаторов переменного объема Ленпипет Лайт 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл (Россия). Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений [8] и имели действительные свидетельства о поверке.

В качестве способа пробоподготовки было предложено осаждение белков плазмы с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ). 250 мкл исследуемой плазмы (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором мелоксикама) вносили в центрифужные пробирки Eppendorf вместимостью 1,5 мл, прибавляли 125 мкл 50 % раствора ТФУ, перемешивали на вортекс-шейкере в течение 1 мин, центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 мин, после чего переносили 200 мкл надосадочной жидкости в вials для ВЭЖХ с микровставками.

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения мелоксикама в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [9] и EMA [10], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Селективность

Для определения специфичности проводили анализ 6 образцов чистой плазмы и образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора мелоксикама до получения концентрации 400 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со

временем удерживания, соответствующим времени удерживания мелоксикама. Хроматограммы чистой плазмы и чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора мелоксикама до получения концентрации 400 нг/мл приведены на рисунках 2-3.

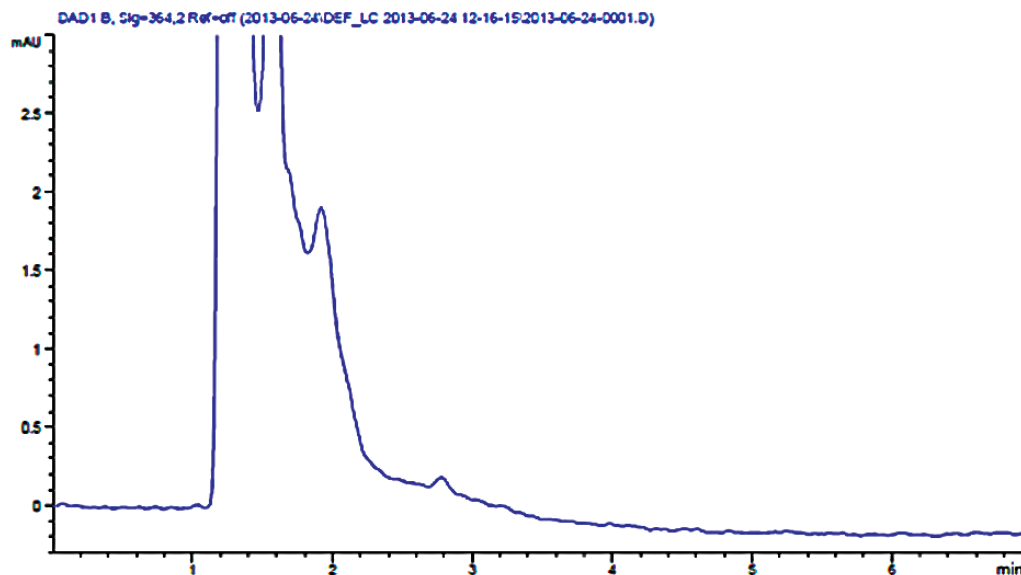


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы.

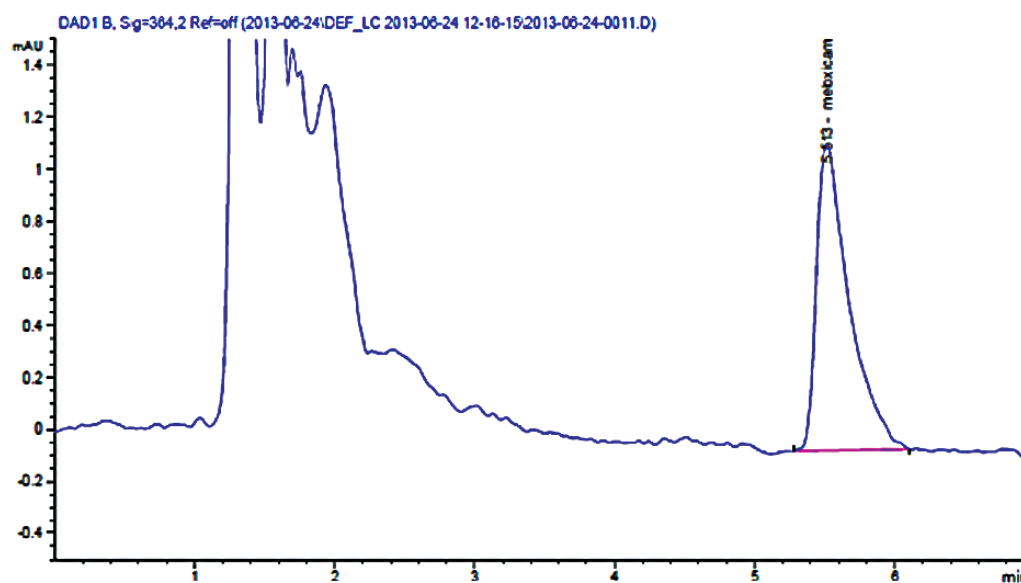


Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора мелоксикама до получения концентрации 400 нг/мл.

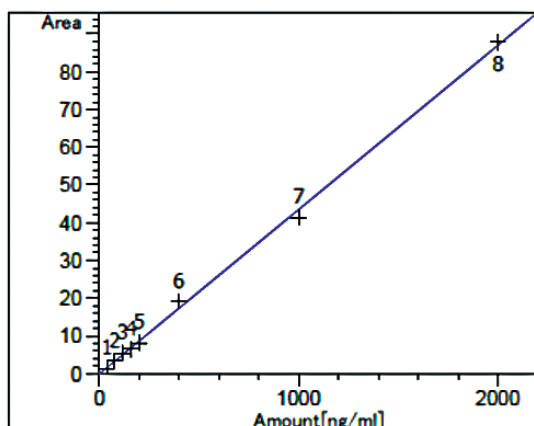
Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки по пику мелоксикама составила 4098 теоретических тарелок, фактор симметрии составил 0,44.

Линейность

Проводили анализ 8 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора мелоксикама до получения концентраций: 40 нг/мл, 80 нг/мл, 120 нг/мл, 160 нг/мл, 200 нг/мл, 400 нг/мл, 1000 нг/мл и 2000 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики ($r^2 = 0,99934$ и $r^2 > 0,99963$), приведенные на Рис. 4 и 5, совместно с уравнением калибровочной кривой.

Calibration Curves

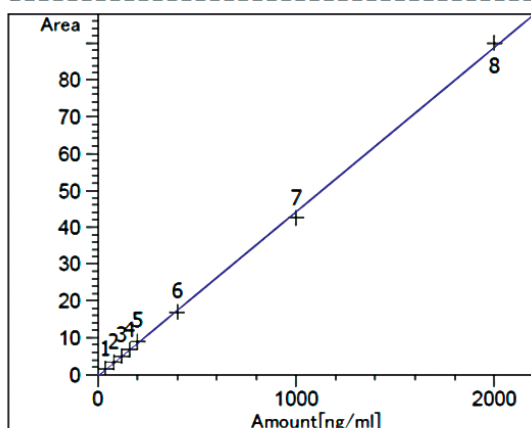


meloxicam at exp. RT: 5.500
DAD1 B, Sig=364,2 Ref=off
Correlation: 0.99934
Residual Std. Dev.: 1.11673
Formula: $y = mx + b$
m: 4.36652e-2
b: -1.36156e-1
x: Amount
y: Area

1290 6/25/2013 2:41:05 PM SYSTEM

Рисунок 4. Калибровочный график №1 зависимости площади пика мелоксикама от его концентрации в плазме.

Calibration Curves



meloxicam at exp. RT: 5.475
DAD1 B, Sig=364,2 Ref=off
Correlation: 0.99963
Residual Std. Dev.: 0.85239
Formula: $y = mx + b$
m: 4.47767e-2
b: -4.95225e-1
x: Amount
y: Area

Рисунок 5. Калибровочный график №2 зависимости площади пика мелоксикама от его концентрации в плазме.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в Таблице 1.

Код пробы	24 pl 200	24 pl 400	24 pl 600	24 pl 800	24 pl 1000	24 pl 2000	24 pl 5000	24 pl 10000
$C_{\text{факт}} \text{ нг/мл}$	40	80	120	160	200	400	1000	2000
$C_{\text{рассчит}} \text{ нг/мл}$	35	86	125	162	196	439	943	2019
$\epsilon, \%$	-12,5	7,5	4,2	1,3	-2,0	9,8	-5,7	1,0
Норма	Не более 20 %							
	Не более 15%							

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений. Полученные отклонения соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек).

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора мелоксикама до получения концентраций: 40 нг/мл, 200 нг/мл, 2000 нг/мл. Каждый раствор хроматографировали 3 раза. Исследование проводили в течение 1-го дня (intra-day)

и двух дней (inter-day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в Таблицах 2 и 3.

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=3)	S.D. (n=3)	RSD, % (n=3)	ϵ , %
40	35	34,333	1,15	3,36	-14,17
	33				
	35				
200	196	200,667	4,16	2,07	0,33
	202				
	204				
2000	2019	2013,667	7,57	0,38	0,68
	2017				
	2005				

Таблица 2. Правильность и прецизионность методики (intra-day).

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=3)	S.D. (n=3)	RSD, % (n=3)	ϵ , %
40	42	38,167	4,31	11,29	-4,58
	43				
	41				
200	219	209,833	11,05	5,27	4,92
	213				
	225				
2000	2003	1998,667	20,22	1,01	-0,07
	1977				
	1971				

Таблица 3 Правильность и прецизионность методики (inter-day)

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных двух концентраций).

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. Предел количественного определения методики составил 40 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 6.

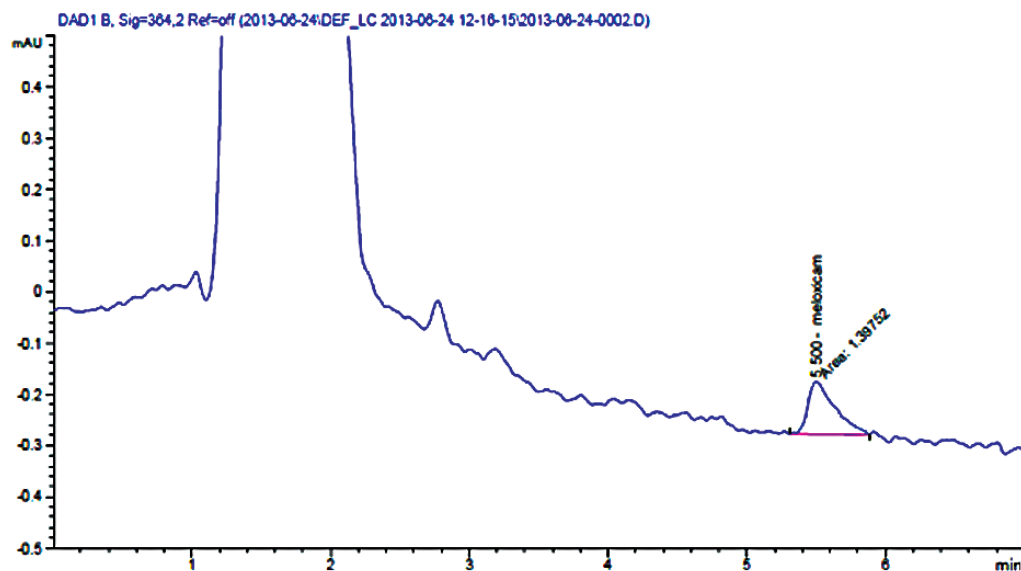


Рисунок 6. Хроматограмма чистой плазмы с содержанием мелоксикама на уровне ПКО. (40 нг/мл).

Стабильность

Стабильность была подтверждена для исходного и стандартных растворов мелоксикама (при хранении раствора в течение 14 сут при температуре от 2 до 8 °C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день), долговременная стабильность (при хранении в морозильнике при температуре от - 35 до 40 °C).

Выводы

Разработана методика определения мелоксикама в плазме крови человека методом ВЭЖХ с применением УФ-детектирования. Методика показала высокую чувствительность, точность и воспроизводимость. Данная методика может быть использована для количественного определения мелоксикама в плазме крови добровольцев для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС мелоксикама — таблеток и суппозиторий в дозировке 15 мг (ожидаемый фармакокинетический диапазон концентраций: 50 — 1500 нг/мл) [7].

Список литературы

1. Справочник лекарств РЛС.
URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2229.htm
Проверено 1.07.2013
2. Без отложенного спроса: препараты мелоксикама
URL: <http://www.remedium.ru/section/pharmwork/detail.php?ID=50441> Проверено 1.07.2013.
3. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП). Утвержден распоряжением Правительства РФ от 7 декабря 2011 г. № 2199-р. – М., 2011.
4. A. Medvedovici, F. Albu, C. Georgita, C. Mircioiu, V. David. A non-extracting procedure for the determination of meloxicam in plasma samples by HPLC-diode array detection // *Arzneimittelforschung*. 2005. Vol. 5. No 6. P. 326-31.
5. J.W. Bae, M.J. Kim, C.G. Jang, S.Y. Lee. Determination of meloxicam in human plasma using a HPLC method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007. Vol. 859. No. 1. P. 69-73.
6. Y. Yuan, X. Chen, D. Zhong. Determination of meloxicam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry following transdermal administration // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007. Vol. 852. No 1-2. P. 650-654.
7. H.M. Rigato, G.D. Mendes, N.C. Borges, R.A. Moreno. Meloxicam determination in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) in Brazilian bioequivalence studies // *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2006 Vol. 44. No. 10. P. 489-98.
8. Государственный реестр средств измерений. URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx. Проверено 13.06.2013.
9. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
10. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
<http://www.your-analytical-solution.com>

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in USA, September 1, 2013
5991-2993RURU

