

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2-ФЕНИЛМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТОВ БУТАМИРАТА

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

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

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М.Сеченова Минздрава
России

Разработана методика определения основного метаболита противокашлевого препарата бутамина — 2-фенилмасляной кислоты — в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с целью изучения фармакокинетики препаратов бутамина. Пробоподготовку проводили путем осаждения белков метанолом. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность. Аналитический диапазон методики составил 50 нг/мл — 2000 нг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для исследований биоэквивалентности препаратов бутамина цитрата.

Введение

В настоящее время в России после вступления в действие постановления правительства РФ от 20.07.2011 № 599 «О мерах по контролю в отношении препаратов, которые содержат малые количества наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации», запретившего безрецептурной реализации кодеинсодержащих (в т.ч. противокашлевых) препаратов [1], наблюдается повышенный интерес к противокашлевым препаратам, отпускающимся из аптек без рецепта врача и не обладающих наркотическим действием. Одним из таких препаратов является бутамина, выпускаемый в виде капель и сиропа (в т.ч. для детей), а также таблеток пролонгированного действия.

Бутамина — противокашлевое средство, влияющее непосредственно на кашлевой центр. Являясь сложным эфиром по химической структуре, бутамина легко гидролизует в кислой среде желудка и всасывается в кровоток в виде основного метаболита — 2-фенилмасляной кислоты, которая обуславливает противокашлевое действие препарата. В неизменном виде препарат



практически не всасывается в системный кровоток. Действие препарата наступает в течение 2-3 ч, что ставит данный препарат по эффективности в один ряд с кодеином и другими противокашлевыми лекарственными средствами, обладающими наркотическим действием. Вместе с тем, препарат не имеет серьёзных побочных явлений, что позволяет широко применять препараты бутамина в детской практике [2].

Ниже представлена структурная формула бутамина:

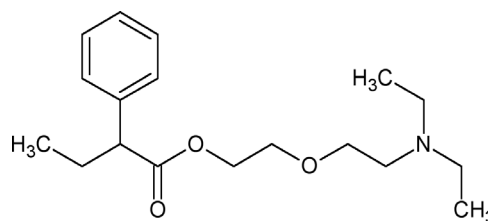


Рисунок 1. Структурная формула бутамина.

Являясь по структуре сложным эфиром 2-фенилмасляной кислоты, препарат, как уже сказано выше, легко подвергается гидролизу в кислой среде желудка. В связи с этим, дальнейшие исследования, целью которых была разработка методики для изучения фармакокинетики препаратов бутамина, были направлены на количественное определение в плазме крови 2-фенилмасляной кислоты, как основного метаболита препарата. В литературе было найдено множество публикаций, посвящённых количественному определению 2-фенилмасляной кислоты в плазме крови. Исследования проводились методами газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором [3], жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием [4] и жидкостной хроматографии с УФ-детектированием [5]. Пределы количественного обнаружения данных методик составил 50-200 нг/мл. Нами был выбран для разработки метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием, т.к. этот метод обеспечивает достаточную чувствительность и селективность для проведения фармакокинетических исследований 2-фенилмасляной кислоты в плазме крови человека (ожидаемый диапазон концентраций 2-фенилмасляной кислоты в плазме крови для исследований биоэквивалентности после однократного приема – 0,1 – 2,0 мкг/мл) [5].

Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1260 четырехканальный насос	G1311B
1260 термостат колонок	G1316A
1260 автосамплер	G1329B
1260 диодно-матричный детектор	G1315D

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	20 °C
Подвижная фаза	50 mM фосфатный буферный раствор pH 2,5/ацетонитрил (60:40)
Объем вводимой пробы	50 мкл
Детектирование	длина волны 210±4 нм с записью спектра в диапазоне 200-400 нм
Время хроматографирования одной пробы	12 минут
Время удерживания	6,9 мин

Программное обеспечение

ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies

Растворы и реактивы

2-фенилмасляная кислота, субстанция-порошок (серия №15011012, годен до 10.2014, 99,9% основного вещества); ацетонитрил для ВЭЖХ (gradient grade, Scharlau); метанол (gradient grade, J.T. Baker, Голландия); фосфорная кислота (х.ч.); натрия фосфат дигидрат (extra pure, Scharlau); трифторуксусная кислота (х.ч.), вода Milli-Q; вода очищенная.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре от –35 до –40 °C. Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 °C.

Исходный раствор 2-фенилмасляной кислоты готовили путём растворения навески стандарта в метаноле и хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 °C. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора 2-фенилмасляной кислоты водой Milli-Q (Millipore, Milli-Q Advantage A10, Франция).

Пробоподготовка

Для пробоподготовки использовали шейкер типа “вортекс” Heidolph Reax Top (Германия); ультрацентрифугу Thermo Scientific SL16, EC. Взятие навесок осуществляли с помощью весов A&D GR-200 (Япония). Определение pH буферных растворов проводили при помощи pH/мВ-метра pH 330i, WTW (Германия). Дозирование реактивов и биоматериала по объёму осуществляли с помощью дозаторов Ленпипет Лайт 100-1000 мкл и 10-100 мкл. Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений [6] и имели действительные свидетельства о поверке.

В качестве способа пробоподготовки были опробованы способ экстракции 2-фенилмасляной кислоты из подкисленной плазмы в этилацетат, осаждение белков ацетонитрилом, метанолом и 50% раствором трифторуксусной кислоты (ТФУ). При использовании раствора ТФУ в качестве осаждающего агента удалось достичь наиболее низких значений ПКО (менее 40 нг/мл), однако в данном случае в методике не была подтверждена линейность в диапазоне 40 – 2000 нг/мл. Осаждение белков ацетонитрилом снижало предел количественного обнаружения до 100 нг/мл. В случае с экстракцией не удалось получить удовлетворительных результатов по чувствительности методики из-за достаточно высокой растворимости неионизированной формы 2-фенилмасляной кислоты в воде.

В результате на основании серии экспериментов для анализа был выбран способ осаждения белков плазмы метанолом. Для этого к 300 мкл исследуемой плазмы (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором 2-фенилмасляной кислоты), предварительно помещённой в центрифужные пробирки типа “Eppendorf” вместимостью 1,5 мл, прибавляли 900 мкл метанола, встряхивали на шейкере в течение 20 с, далее центрифугировали в течение 10 мин при 15200 об/мин и отделяли надосадочную жидкость, которую переносили в вials для хроматографа.

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения 2-фенилмасляной кислоты в плазме крови человека проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [7] и EMA [8], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного обнаружения.

Селективность

Для определения специфичности проводили анализ 6 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 2-фенилмасляной кислоты в диапазоне концентраций 50 нг/мл – 2000 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания 2-фенилмасляной кислоты. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рисунках 2 и 2а.

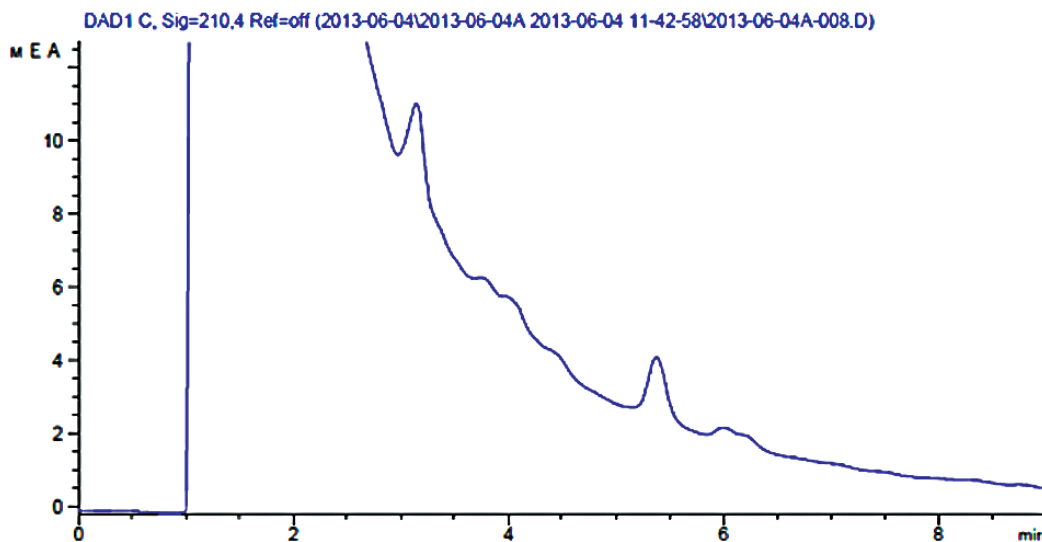


Рисунок 2. Хроматограмма образца чистой плазмы.

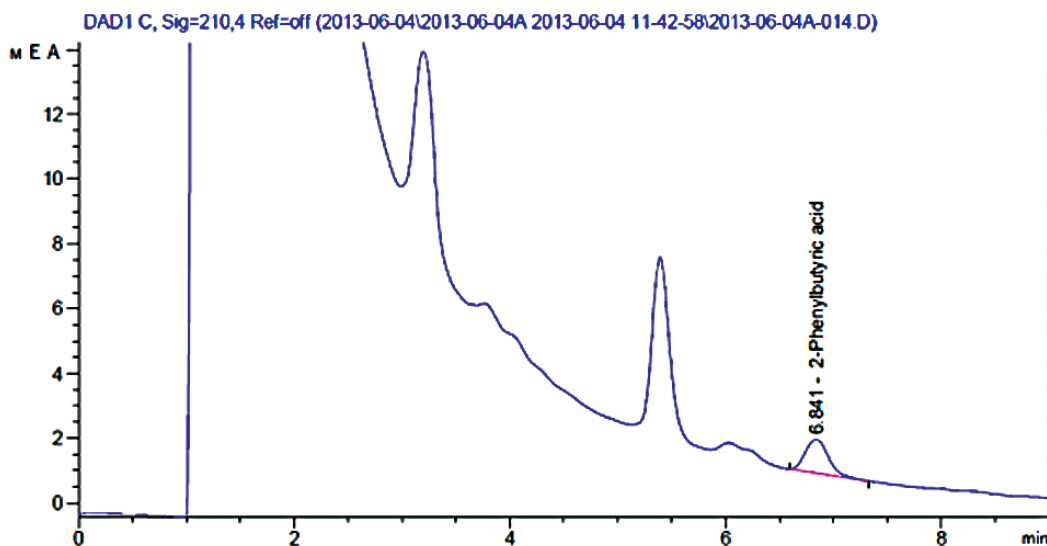


Рисунок 2а. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 2-фенилмасляной кислоты (500 нг/мл).

Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки по пику 2-фенилмасляной кислоты составила 6515 теоретических тарелок, фактор асимметрии составил 0,92.

Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 2-фенилмасляной кислоты до получения концентраций: 50 нг/мл, 100 нг/мл,

250 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл и 2000 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочный график ($r^2 = 0,99964$), приведенный на Рис. 3, совместно с уравнением калибровочной кривой. Наилучшие результаты по показателю "линейность" были получены в именно случае использования осаждения белков метанолом в качестве пробоподготовки.

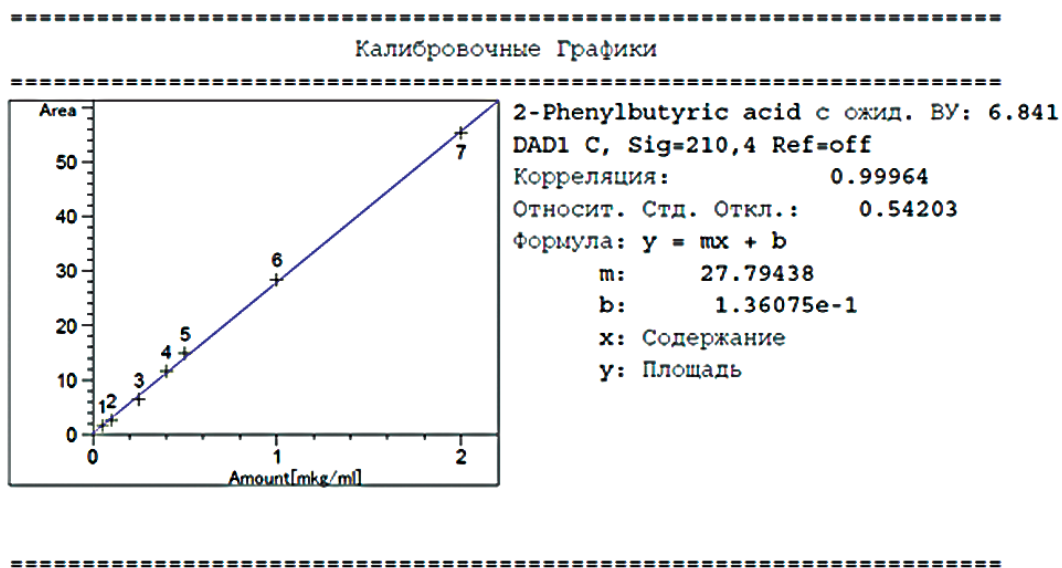


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости площади пика 2-фенилмасляной кислоты от ее концентрации в плазме.

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

Полученные отклонения соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек).

$C_{\text{факт}}, \text{ нг/мл}$	50	100	250	400	500	1000	2000
$C_{\text{рассчит}}, \text{ нг/мл}$	48	87	226	408	531	1017	1986
$\epsilon, \%$	-4	-12,2	-9,4	2,0	6,1	1,7	-0,7
Норма	Не более 20 %		Не более 15 %				

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 2-фенилмасляной кислоты до получения концентраций: 50 нг/мл, 500 нг/мл, 2000 нг/мл. Каждый раствор хроматографировали по 3 раза.

Исследование проводили в течение 1-го дня (intra - day) и 2-го дня (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 , %
50	48	50,0	5,3	10,6	0,0
	46				
	56				
500	531	544,0	12,5	2,3	8,8
	556				
	545				
2000	1986	1991,3	9,2	0,5	-0,4
	2002				
	1986				

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

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=6)	S.D. (n=6)	RSD, % (n=6)	ϵ , %
50	46	49,8	4,8	9,7	-0,3
	47				
	56				
500	511	518,8	30,5	5,9	3,8
	478				
	492				
2000	1959	1978,8	15,4	0,8	-1,1
	1971				
	1969				

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 согласно на основании данных линейности,

правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация 2-фенилмасляной кислоты в плазме, для которой возможно количественное обнаружение 2-фенилмасляной кислоты со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 50 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 4.

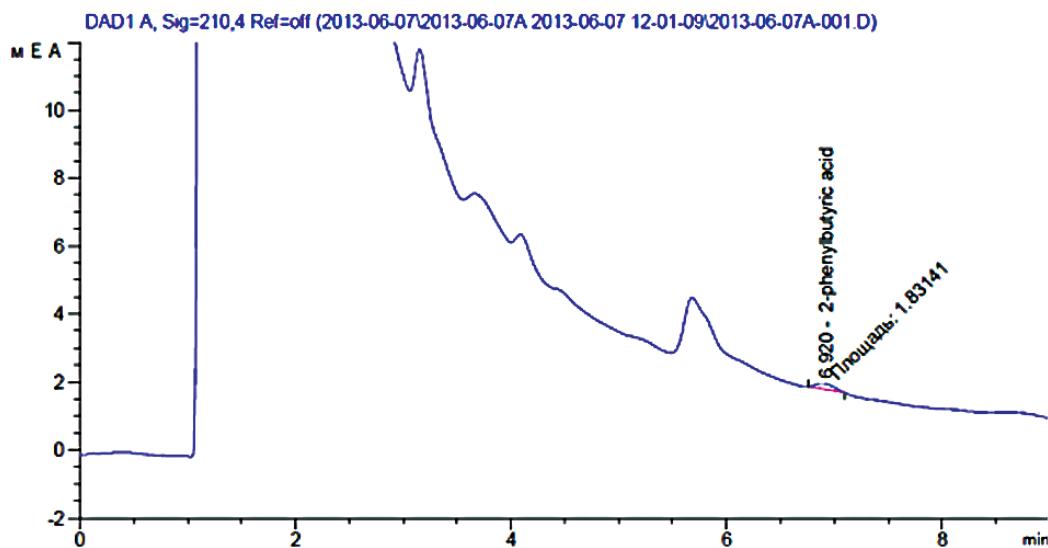


Рисунок 4. Хроматограмма плазмы с содержанием 2-фенилмасляной кислоты на уровне ПК0.

Стабильность

Стабильность образцов была подтверждена для стандартных растворов 2-фенилмасляной кислоты (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре 2-8 °C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день), долговременная стабильность в течение 1 мес на уровнях концентраций 50 нг/мл и 2000 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Выводы

Разработана методика определения 2-фенилмасляной кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ с применением УФ-детектирования, обладающая достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения 2-фенилмасляной кислоты в плазме крови с целью изучения фармакокинетики препаратов бутамирата, в том числе для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС. Методика была валидирована по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Список литературы

1. Постановление Правительства РФ от 20.07.2011 № 599 «О мерах по контролю в отношении препаратов, которые содержат малые количества наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».
2. Справочник лекарств РЛС.
URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_651.htm
Проверено 01.07.2013
3. Tsamis MT, Mange AM, Farinotti R, Mahuzier G. Assay of 2-phenylbutyric acid in plasma with gas and liquid chromatography. J Chromatogr. 1983 Oct 14;277:61-9.
4. Laryea MD, Herebian D, Meissner T, Mayatepek E. Simultaneous LC-MS/MS determination of phenylbutyrate, phenylacetate benzoate and their corresponding metabolites phenylacetylglutamine and hippurate in blood and urine. J Inher Metab Dis. 2010 Aug 7. [Epub ahead of print].
5. Bohnert H, Janiak PS, Nitsche V, Eichinger A, Schütz H. Relative bioavailability of different butamirate citrate preparations after single dose oral administration to 18 healthy volunteers. Int J Clin Pharmacol Ther. 1997 Mar;35(3):117-22.
6. Государственный реестр средств измерений. URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx. Проверено 13.06.2013.
7. 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.
8. 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
5991-2994RURU

