

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРХЛОЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИОН-ПАРНОЙ ВЭЖХ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

Г.В. Раменская, С.В. Смердин,
Ю.В. Медведев, И.Е. Шохин,
Т.А. Ярушок, А.Ю. Савченко,
В.Ю. Карлина

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

Разработана методика определения инновационного противотуберкулезного средства перхлорона в плазме крови человека методом ион-парной 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 от 0,2 до 20 мкг/мл. Разработанная методика позволяет проводить определение концентрации перхлорона в крови как добровольцев так и пациентов на фоне приема других противотуберкулезных препаратов и может быть применена как для фармакокинетических исследований, так и для терапевтического мониторинга.

Введение

Перхлорон — инновационное противотуберкулезное средство, разработанное в России Иркутским институтом химии имени А.Е. Фаворского СО РАН и ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» совместно с ОАО «Фармасинтез». Данное лекарственное средство является сегодня единственным новым за последние 40 лет препаратом в мире для лечения туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью. Премьер-министр России Д.А. Медведев отметил на совещании в Сколково, что препарат «Перхлорон» является прорывом в современной медицине [1].

Перхлорон обладает выраженным, строго избирательным ингибирующим действием на жизнеспособность микобактерий туберкулеза, чувствительных и устойчивых к существующим противотуберкулезным препаратам. Механизм действия препарата не известен. Перхлорон является малотоксичным веществом, не оказывает структурно-функциональных нарушений жизненно



важных органов и систем, а также раздражающего действия на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, не проявляет аллергенных, иммунотоксических, мутагенных свойств. Структурная формула перхлозона приведена на Рисунке 1 [2].

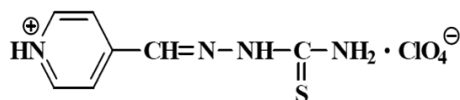


Рисунок 1. Структурная формула перхлозона.

Для инновационных лекарственных средств актуальной задачей является разработка чувствительных и селективных аналитических методик для его определения в биологических жидкостях. В литературе найдена единственная публикация, посвященная количественному определению перхлозона в плазме крови. Определение проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием. Степень извлечения перхлозона из плазмы составила 88 %. Аналитический диапазон методики составил 10-10000 нг/мл для масс-спектрометрического детектирования и 250-10000 нг/мл для УФ-детектирования [3]. В то же время, данная методика не позволяла проводить определение концентрации перхлозона в плазме крови пациентов на фоне сопутствующей противотуберкулезной терапии. Цель данной работы заключалась в разработке и валидации методики определения перхлозона в плазме крови человека, которая могла бы быть применима как для фармакокинетических исследований, так и для терапевтического мониторинга на фоне сопутствующей терапии.

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	25 °C
Подвижная фаза	50 mM фосфатный буфер с 5 mM октансульфонатом натрия pH 2,50 — ацетонитрил (85:15)
Скорость потока	1 мл/мин
Объем вводимой пробы	50 мкл
Детектирование	длина волны 347±4 нм с записью спектра в диапазоне 220-400 нм
Время хроматографирования одной пробы	8 минут
Время удерживания	5 — 6 мин

Программное обеспечение

ChemStation ver. B.03.01

Растворы и реактивы

Перхлорон, субстанция порошок, получен от ОАО «Фармасинтез», Россия (содержание перхлорона 99,7%); ацетонитрил Super Gradient, Lab-Scan Analytical Sciences; калия дигидрофосфат (х.ч.), фосфорная кислота

концентрированная (х.ч.), трифторуксусная кислота (ТФУ) концентрированная (х.ч.), октансульфонат натрия (для ВЭЖХ), вода очищенная, вода Milli-Q.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы крови (Pozis, MM-180/20/35, Россия) при температуре 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 перхлорона готовили растворением навески в метаноле и хранили при температуре от –35 °C до –40 °C. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора перхлорона водой Milli-Q (Millipore, Milli-Q Advantage A10, Франция).

Пробоподготовка

Для пробоподготовки применяли вортекс-шейкер Reax top (Heidolph, Германия), центрифугу SL 16 (Thermo Scientific, США). Определение pH проводилось на pH-метре FiveTM FE-20 Mettler Toledo, Швейцария. Взятие навесок осуществляли на аналитических весах Mettler Toledo, AL 204, Швейцария. Дозирование плазмы по объему осуществляли при помощи дозаторов переменного объема Ленпипет Дигитал 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл, Россия. Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений [4] и имели действительные свидетельства о поверке.

В качестве способа пробоподготовки было предложено осаждение белков плазмы с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ). 150 мкл исследуемой плазмы (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором перхлорона) вносили в центрифужные пробирки Eppendorf вместимостью 1,5 мл, прибавляли 50 мкл 50 % раствора ТФУ, перемешивали на вортекс-шейкере в течение 1 мин, центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 минут, после чего переносили 125 мкл надосадочной жидкости в микроциалы для ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения перхлозона в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [5] и EMA [6], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного определения.

Селективность

Для определения специфичности проводили анализ 6 образцов чистой плазмы и образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлозона до получения концентрации 1 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания перхлозона. Хроматограммы чистой плазмы и чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлозона до получения концентрации 1 мкг/мл приведены на Рисунках 2-3.

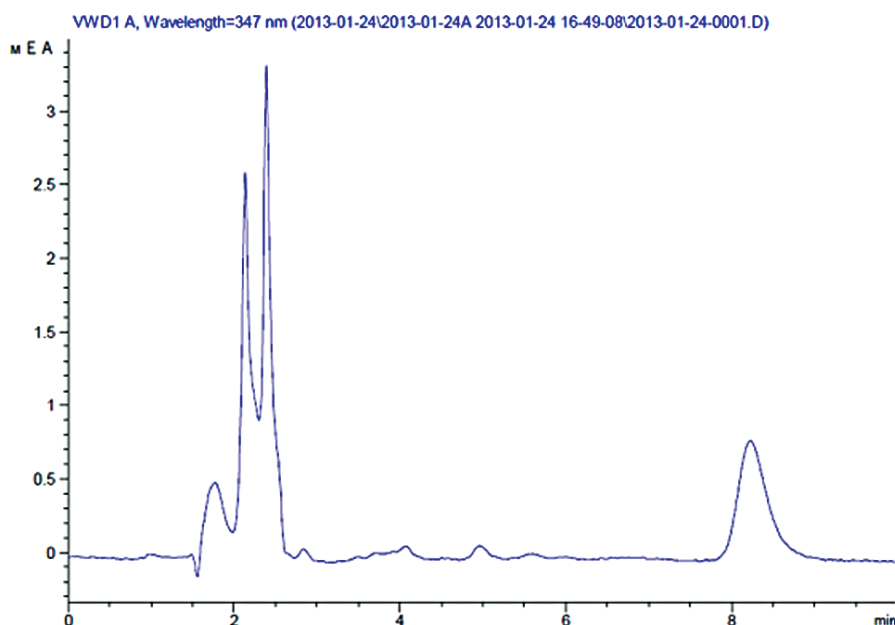


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы.

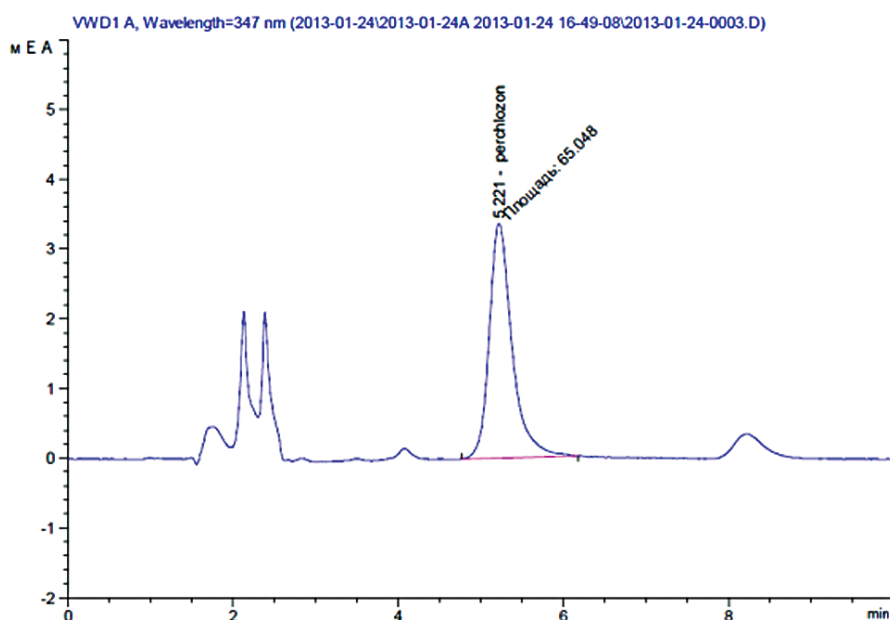


Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлозона до получения концентрации 1 мкг/мл.

Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки по пику перхлорона составила 3676 теоретических тарелок, фактор асимметрии составил 0,9.

Линейность

Проводили анализ 5 образцов чистой плазмы с

прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентраций: 200 нг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ($r^2 > 0,99913$), приведенный на Рисунок 4, и рассчитано уравнение калибровочной кривой.

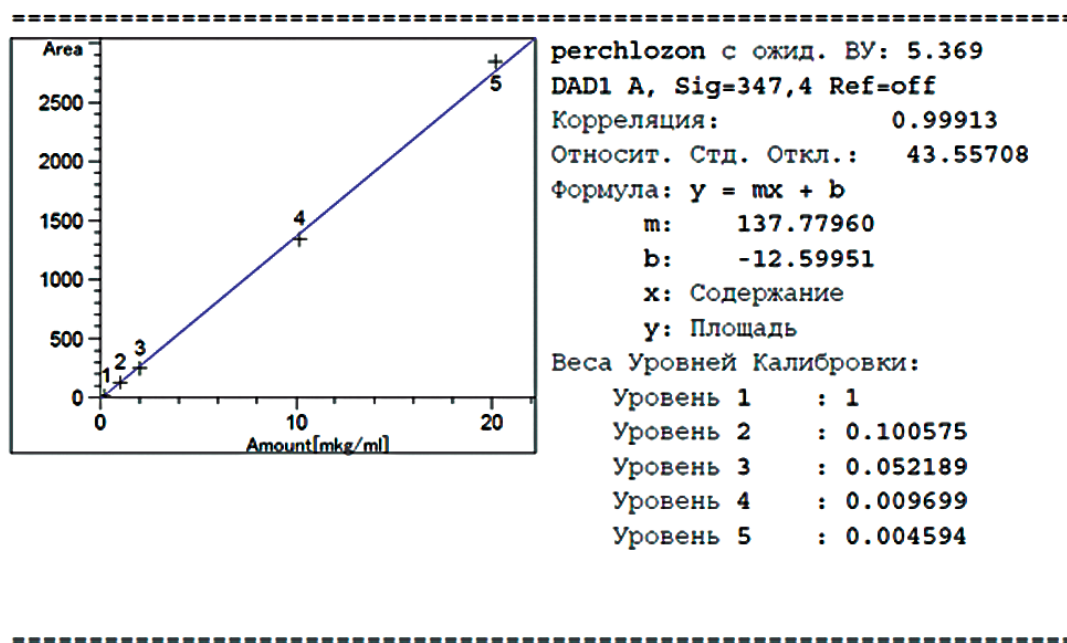


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме

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).

$C_{\text{факт}}$, мкг/мл	0,2	1	2	10	20
$C_{\text{рассчит}}$, мкг/мл	0,18	1,03	1,91	9,86	20,72
ϵ , %	-10	3	-4,5	-1,4	3,6
Норма, не более	20 %	15 %			

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

Правильность и прецизионность

Для оценки прецизионности и правильности методики проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентраций: 200 нг/мл, 2 мкг/мл, 20 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. Для

полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в Таблице 2.

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	ϵ , %
0,2	0,18	0,194	0,01	5,88	-3,00
	0,19				
	0,21				
	0,20				
	0,19				
2	1,91	1,976	0,11	5,42	-1,20
	1,95				
	2,11				
	2,06				
	1,85				
20	20,72	20,520	0,79	3,83	2,60
	21,14				
	21,35				
	19,67				
	19,72				

Таблица 2. Оценка правильности и прецизионности методики.

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 200 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 5.

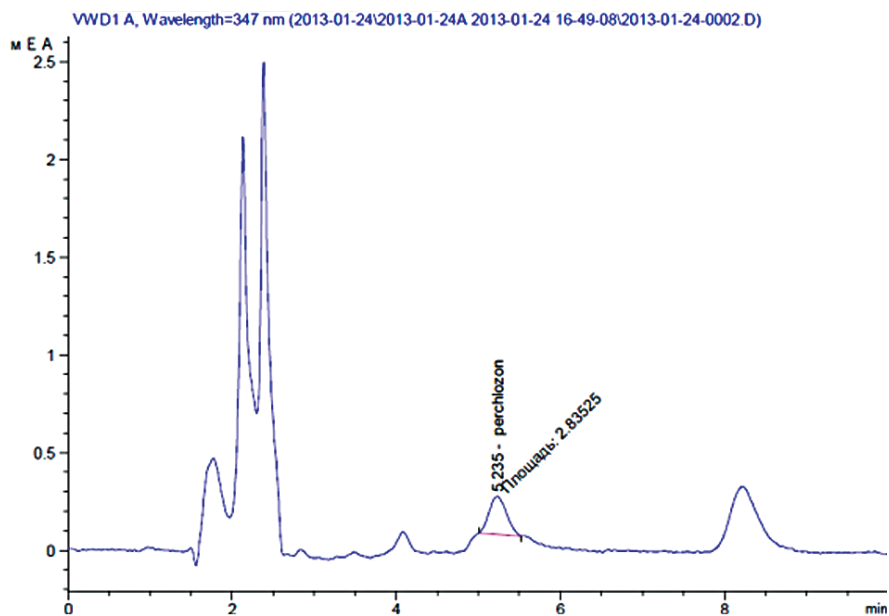


Рисунок 5. Хроматограмма чистой плазмы с содержанием перхлорона на уровне ПКО.

Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов перхлозона (при хранении раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день), долговременная (при хранении в течение 1 мес в морозильнике для плазмы крови при температуре от –35 °С до –40 °С) на уровнях концентраций 200 нг/мл и 20 мкг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Применение к фармакокинетическим исследованиям

Разработанная методика была успешно применена к открытому исследованию I фазы по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости препарата Перхлозон (капсулы 400 мг) у здоровых добровольцев при однократном введении (протокол № PERHL-11-2011), а также к открытому сравнительному рандомизированному многоцентровому исследованию эффективности и безопасности препарата Перхлозон в комплексной терапии больных туберкулезом

легких (протокол ПО2/10). Оба исследования были одобрены Министерством Здравоохранения России и локальными этическими комитетами в установленном порядке. Среди задач первого исследования было исследовать фармакокинетику перхлозона при однократном применении различных доз. Среди задач второго исследования было определить равновесную (стационарную) концентрацию на фоне курсового применения различных доз (800 мг/сутки, 1200 мг/сутки или в дозе 1600 мг/сутки) препарата Перхлозон.

Таким образом, в первом исследовании перхлозон определялся в плазме крови добровольцев, во втором исследовании – в плазме крови пациентов на фоне сопутствующей терапии (I-й режим химиотерапии - Изониазид, Пиразинамид, Рифампицин; IV-й режим химиотерапии - Пиразинамид, Канамицин/Амикацин или Капреомицин, Протионамид/Этионамид, Этамбутол, Циклосерин и ПАСК в соответствии с приказом МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г.) [7].

Типичная хроматограмма плазмы крови добровольцев после приема однократного приема препарата Перхлозон, 400 мг приведена на Рисунке 7.

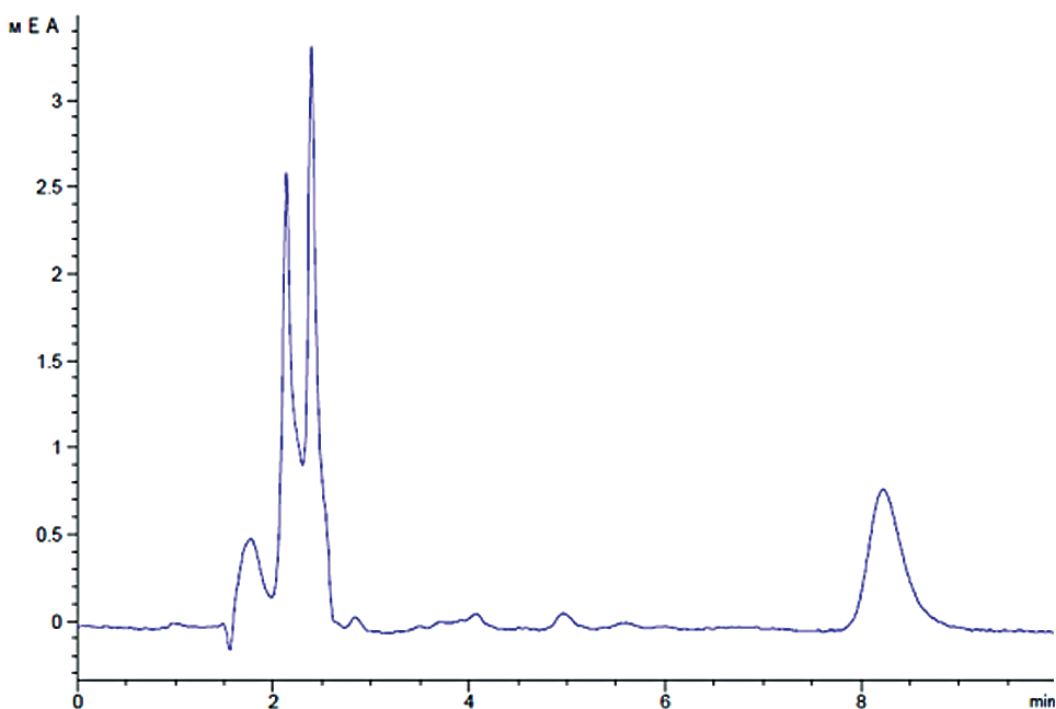


Рисунок 7. Хроматограмма плазмы крови добровольца спустя 3 ч после приема однократного приема препарата Перхлозон, 400 мг (Agilent 1260)

Выводы

Разработана методика определения перхлорона в плазме крови методом ион-парной ВЭЖХ с применением УФ-детектирования. Методика показала высокую чувствительность, правильность и воспроизводимость. Данная методика может быть использована как для фармакокинетических исследований, так и для терапевтического мониторинга на фоне сопутствующей терапии противотуберкулезными препаратами.

Список литературы

1. Пресс-релиз ОАО «Фармасинтез». URL: <http://pharmasyntez.com/node/128>. Проверено 13.06.2013.
2. Государственный реестр лекарственных средств. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>. Проверено 13.06.2013.
3. А.М. Власов, Ю.Н. Башкатова, А.Ю. Савченко, М.Р. Хаитов, Г.В. Раменская. Определение перхлорона в плазме крови с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием // Биомедицина. — № 2. — М., 2011. — С. 73-78.
4. Государственный реестр средств измерений. URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx. Проверено 13.06.2013.
5. 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.
6. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.
7. Приказ Минздрава РФ № 109 (ред. от 29.10.2009) «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» от 21.03.2003.

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
5991-2997RURU

