

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ПЕРЕНОС МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРХЛОЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИОН-ПАРНОЙ ВЭЖХ НА СТАНЦИЮ AGILENT 1260

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, 119991, Россия, г.
Москва, ул. Трубецкая, д. 8.



Произведен перенос методики определения инновационного противотуберкулезного средства перхлорона в плазме крови человека методом ион-парной ВЭЖХ с УФ-детектированием с хроматографической станции Waters Alliance 2695 на Agilent 1260. Показано, что основные валидационные характеристики методики (селективность, линейность, правильность, прецизионность и предел количественного определения) в аналитическом диапазоне 0,2 – 20 мкг/мл сохранили допустимые значения.

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».

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 перхлорона приведена на Рисунке 1 [1].

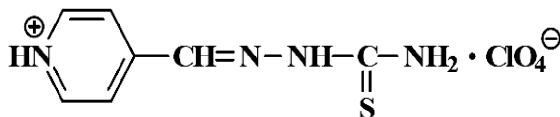


Рисунок 1. Структурная формула перхлорона.



На данный момент разработана методика количественного определения перхлорона в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием с аналитическим диапазоном методики 10-10000 нг/мл для масс-спектрометрического детектирования и 250-10000 нг/мл для УФ-детектирования [2]. Так же существует методика количественного определения перхлорона методом ион-парной ВЭЖХ с УФ детектированием, которая может быть применена для определения перхлорона как у добровольцев, так и у пациентов на фоне приема других противотуберкулезных препаратов [3].

Для переноса ВЭЖХ методики было выбрано две хроматографические системы - исходная хроматографическая система: хроматограф Waters Alliance 2695 с автосамплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором Waters 2998 (Waters, США) под управлением программного обеспечения Waters Empower Pro 2. Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке Waters Atlantis T3 150 x 4,6 мм, 5 мкм с предколонкой Waters Atlantis T3 4,6 x 20 мм. Система для переноса методики: хроматограф Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), оснащенный градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, диодноматричным УФ-детектором G1315D. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation (ver. B.03.01). Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 150 x 4,6 мм, 5 мкм с предколонкой Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5 x 4,6мм 5 мкм.

В данной работе продемонстрирован перенос методики определения перхлорона в крови методом ион-парной ВЭЖХ с УФ детектированием.

Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1260 градиентный 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±2 нм с записью спектра в диапазоне 190-400 нм

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), pH-метр FiveTM FE-20 Mettler Toledo (Швейцария), аналитические весы Mettler Toledo, AL 204 (Швейцария), дозаторы переменного объема Ленпипет Дигитал 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл (Россия). В качестве способа пробоподготовки применялось осаждение белков плазмы с помощью раствора 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 микровиалы для ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение

Существующая методика [3] определения перхлорона методом ион-парной ВЭЖХ с УФ детектированием была перенесена с системы Waters Alliance на систему Agilent 1260 HPLC без изменения состава подвижной фазы, скорости потока, объема вводимой пробы и условий детектирования. При этом была произведена замена хроматографической колонки Waters Atlantis T3 на колонку Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18.

Валидация методики

Валидацию методики при ее переносе определения перхлорона в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [4] и ЕМА [5], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения. Следует отметить, что согласно нормативным документам FDA [4] и ЕМА [5] при переносе биоаналитической методики на новую хроматографическую станцию или в другую лабораторию проводится частичная валидация методики (по основным валидационным характеристикам – селективность, линейность, правильность, прецизионность).

Селективность

Для определения специфичности хроматографических систем проводили анализ 6 образцов чистой плазмы и образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентрации 1 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания перхлорона.

Линейность

Для определения линейности на каждой хроматографической системе 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 были построены калибровочные графики. Калибровочный график для системы Waters ($r^2 > 0,998$), приведен на Рисунке 2. Калибровочный график для системы Agilent ($r^2 > 0,99913$), приведен на Рисунке 3.

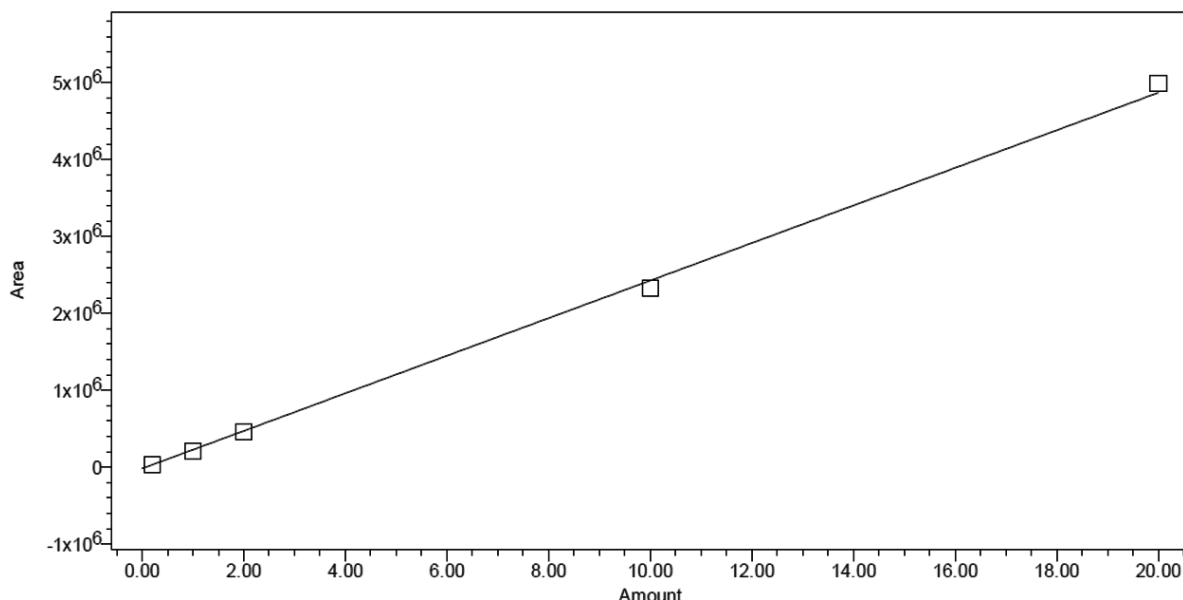
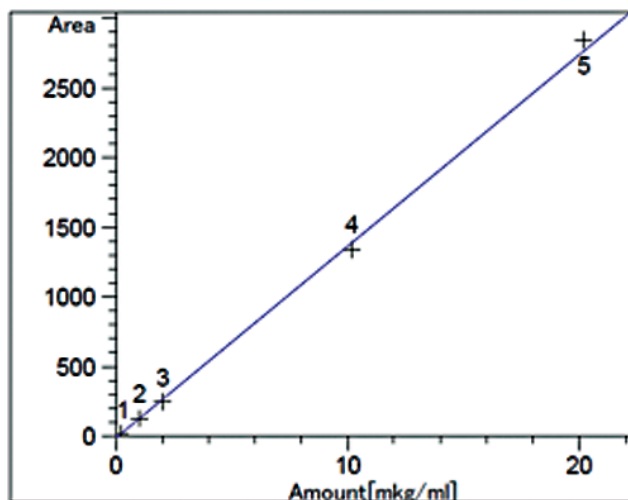


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме; система Waters.



perchlozon с ожид. ВУ: 5.369
DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off
Корреляция: 0.99913
Относит. Стд. Откл.: 43.55708
Формула: $y = mx + b$
m: 137.77960
b: -12.59951
x: Содержание
y: Площадь
Веса Уровней Калибровки:
Уровень 1 : 1
Уровень 2 : 0.100575
Уровень 3 : 0.052189
Уровень 4 : 0.009699
Уровень 5 : 0.004594

Рисунок 3. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме; система Agilent.

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

Система Waters Alliance					
С_{факт} мкг/мл	0,2	1	2	10	20
С_{рассчит} мкг/мл	0,23	0,92	1,94	9,62	20,51
ε, %	12,73	-8,28	-3,12	-3,85	2,53
Норма, не более	20 %	15 %			
Система Agilent HPLC 1260					
С_{факт} мкг/мл	0,2	1	2	10	20
С_{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.

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

Правильность и прецизионность

Для оценки прецизионности и правильности методик 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 (€, %), приведенные в Таблице 2.

Система Waters Alliance					
введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	€, %
0,2	0,16	0,19	0,02	11,87	-3,00
	0,19				
	0,19				
	0,21				
	0,22				
2	1,95	2,05	0,17	8,13	2,70
	2,31				
	1,87				
	2,05				
	2,09				
20	19,4	20,30	1,18	5,80	1,50
	19,6				
	19,5				
	22,1				
	20,9				
Система Agilent HPLC 1260					
введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	€, %
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 (€, %) соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных двух концентраций).

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методик определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. Предел количественного определения методик составил 200 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики определения перхлорона на системе Agilent 1260, приведена на Рисунке 4.

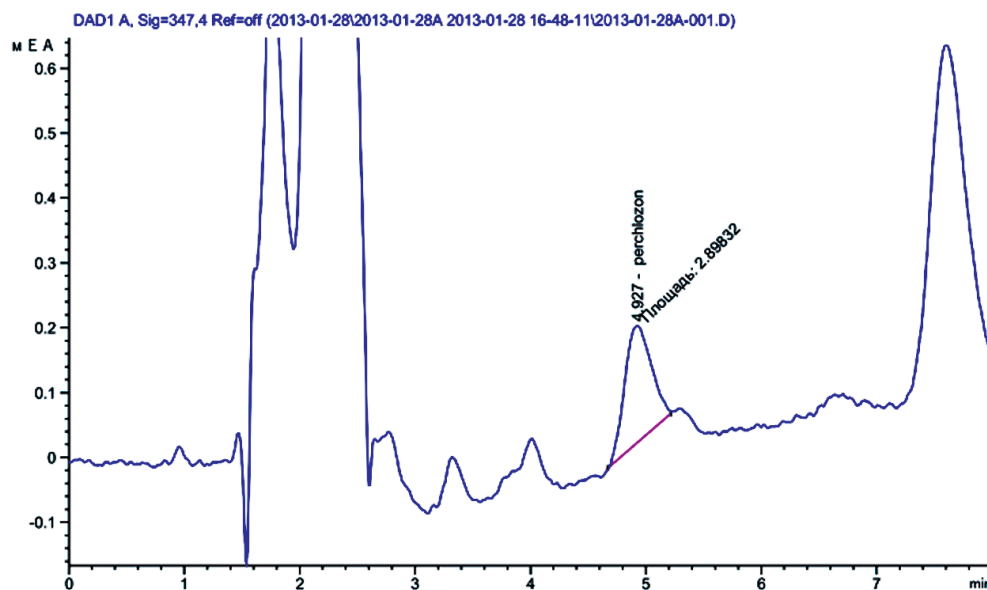


Рисунок 4. Хроматограмма чистой плазмы с содержанием перхлорона на уровне ПКО.

Заключение

Был произведен успешный перенос методики определения перхлорона методом ион-парной ВЭЖХ с УФ – детектированием. При переносе произведена валидация методики по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения. Показано что существующая методика может быть быстро перенесена на другую хроматографическую систему, при сохранении условий ВЭЖХ разделения.

Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств.
URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>. Проверено 13.06.2013.
2. 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.
3. Г.В. Раменская, С.В. Смердин, Ю.В. Медведев,
И.Е. Шохин, Т.А. Ярушок, А.Ю.Савченко,
В.Ю. Карлина. Разработка и валидация определения
перхлорона в плазме методом ион-парной ВЭЖХ // *Agilent Application Note*. В печати
4. 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.
5. 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, October 1, 2013
5991-3216RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies