

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



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].

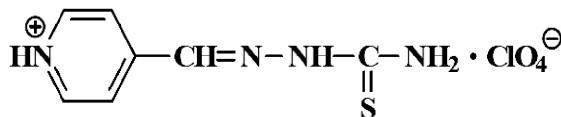


Рисунок 1. Структурная формула перхлорона.



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 EMA [5], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения. Следует отметить, что согласно нормативным документам FDA [4] и EMA [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.

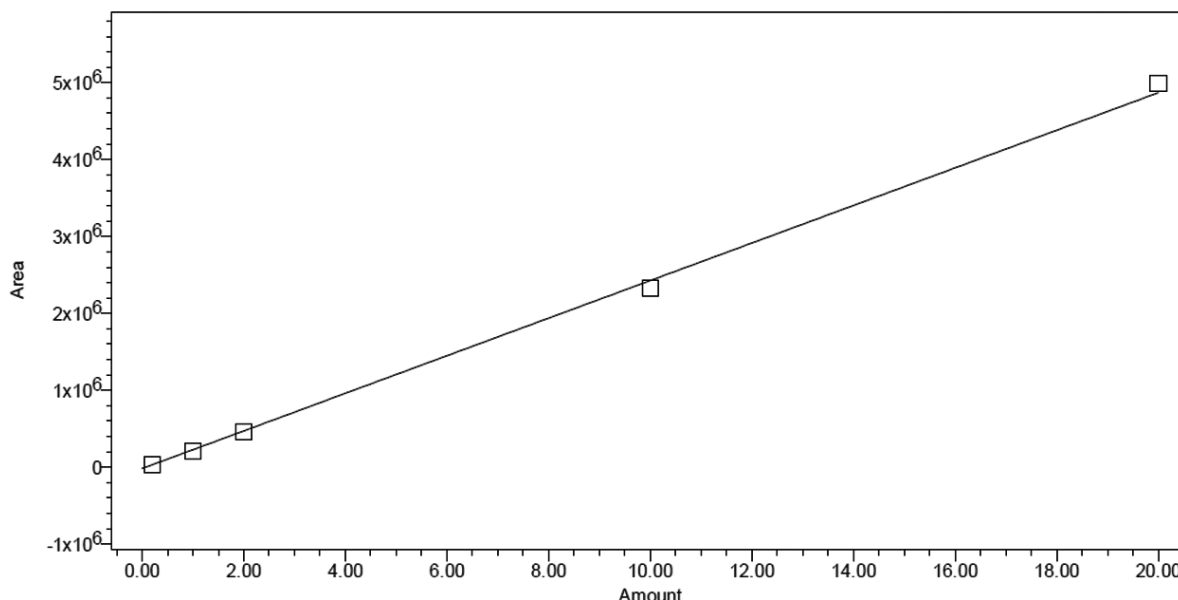
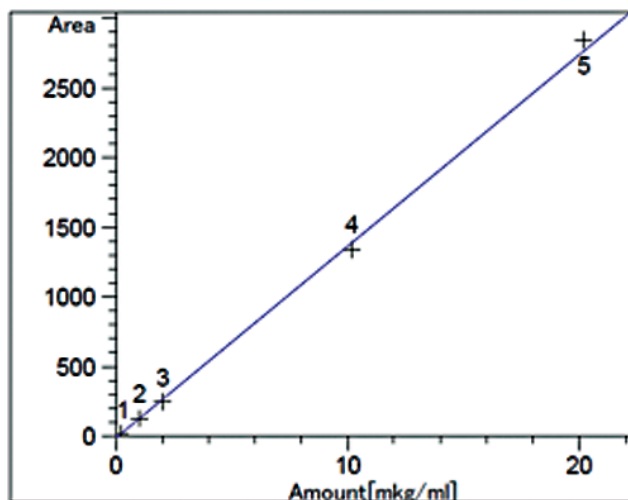


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме; система Waters.



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 перхлорозона 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 перхлорозона 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.

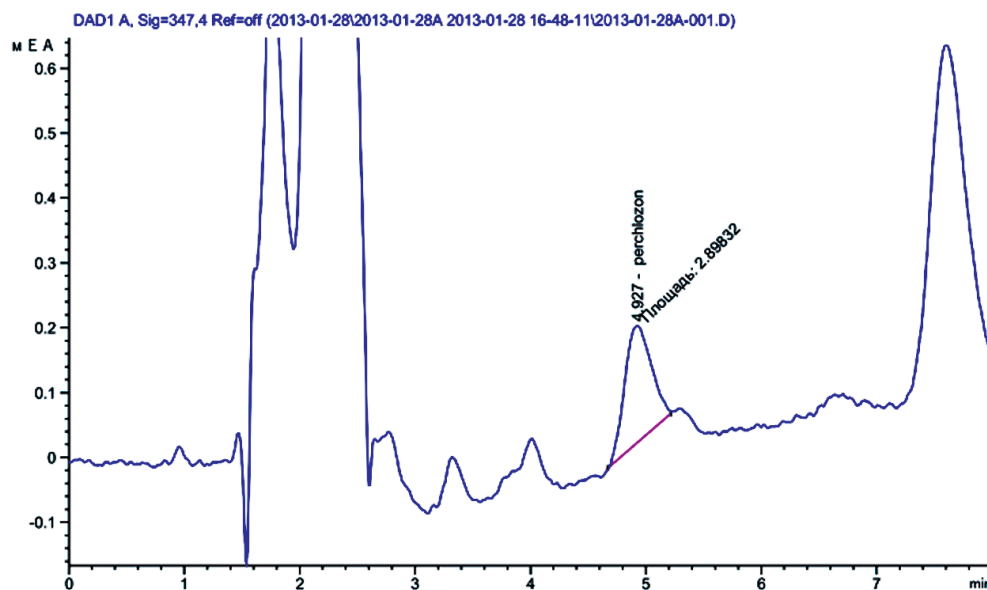


Рисунок 4. Хроматограмма чистой плазмы с содержанием перхлорона на уровне ПКО.

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