

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИМАНТАДИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

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

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М.Сеченова Минздрава
России, 119991, Россия, г.
Москва, ул. Трубецкая, д. 8.



Разработана методика определения препаратов римантадина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с Флуориметрическим детектированием. Пробоподготовку проводили путем жидкость-жидкостной экстракции с последующей дериватизацией дансил хлоридом. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность. Аналитический диапазон методики составил 10,10 – 202,08 нг/мл. Разработанная методика позволяет проводить определение концентрации римантадина в крови пациентов на фоне приема других препаратов и может быть применена как для фармакокинетических исследований, так и для терапевтического мониторинга.

Введение

Римантадин – противовирусный препарат, производное адамантана, обладающее прямым противовирусным действием. Механизм действия римантадина основан на его способности угнетать раннюю стадию специфической репродукции от проникновения вируса в клетку до начальной транскрипции РНК. Наиболее эффективно применение препарата в начальной стадии инфекционного процесса. Римантадин эффективен в отношении вируса гриппа типа А, вируса клещевого энцефалита. При гриппе, вызванном вирусом типа В, римантадин оказывает антитоксическое действие.

При пероральном приеме римантадин хорошо абсорбируется в пищеварительном тракте. Пик плазменной концентрации римантадина отмечается спустя 1-4 ч после приема. Степень связи римантадина с белками плазмы составляет порядка 40%. Римантадина гидрохлорид метаболизируется в печени. Экскретируется активный компонент препарата преимущественно почками, период полувыведения достигает 25-30 ч. У пациентов пожилого



возраста, а также пациентов с нарушенной функцией печени и почек период полувыведения увеличивается. У детей период полувыведения римантадина несколько меньше, чем у взрослых [1].

Римантадин блокирует включение вируса в клетку-хозяина, ингибирует высвобождение вирусного генома в клетке. Оказывает профилактическое действие в отношении гриппозной инфекции, вызванной вирусами, относящимися к РНК-содержащим (вирус гриппа А), оказывает антитоксическое действие при гриппе, вызванном вирусом гриппа В. Не эффективен при других ОРВИ. Структурная формула римантадина приведена на Рисунке 1 [2].

В молекуле римантадина отсутствуют двойные связи, что приводит к тому, что у римантадина отсутствуют максимумы в УФ-спектре поглощения. В то же время наличие первичной алифатической аминогруппы в молекуле позволяет провести ее дериватизацию с последующим количественным определением методом ВЭЖХ с флюориметрическим детектированием. Следует отметить, что в рецензируемых научных журналах отсутствуют публикации по биоаналитическим методикам определения римантадина после его дериватизации дансил хлоридом, что определяет актуальность настоящего исследования.

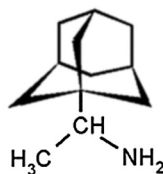


Рисунок 1. Структурная формула римантадина.

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 4,6 x 75 мм 3,5 мкм |
| Предколонка | ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5 x 4,6 мм 5 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Подвижная фаза | 50 мМ фосфатный буферный раствор рН 2,8/ацетонитрил (25:75) |
| Скорость потока подвижной фазы | 1 мл/мин |
| Объем вводимой пробы | 20 мкл |
| Детектирование | длина волны возбуждения 250 нм, эмиссии 520 нм |
| Время хроматографирования одной пробы | 12 минут |
| Время удерживания римантадина | 9,5 мин |

Пробоподготовка

Для пробоподготовки применяли вортекс-шейкер Reax top (Heidolph, Германия), орбитальный шейкер (Biosan OS20, ЕС), испаритель под током азота (Thermo, Reacti-Therm, USA) центрифугу SL 16 (Thermo Scientific, США). Определение рН проводилось на портативном рН/мВ-метре рН 330i, (WTV, Германия). Взятие навесок осуществляли на аналитических весах (A&D GR-200, Япония). 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 [3] и имели действительные свидетельства о поверке.

Пробоподготовку проводили следующим образом. 1 мл чистой плазмы крови (либо плазмы с предварительно

прибавленным стандартным раствором римантадина) вносили в политетрафторэтиленовые пробирки вместимостью 10 мл, прибавляли 100 мкл 0,1 М раствора натрия гидроксида и перемешивали на вортекс-шейкере в течение 1 мин. Далее прибавляли 5 мл гексана, встряхивали на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 10 мин, центрифугировали при 13000 об/мин и отделяли верхний (органический) слой. Органический слой упаривали на испарителе под током азота при 45°С до получения сухого остатка. К полученному сухому остатку прибавляли 250 мкл боратного буфера рН 9,5 и 200 мкл 1% раствора дансил хлорида в ацетонитриле и проводили дериватизацию при 45°С в течение 30 мин, далее вновь упаривали на испарителе под током азота при 45°С до получения сухого остатка. Полученный сухой остаток растворяли в 200 мкл подвижной фазы и центрифугировали при 14500 об/мин, затем переносили надосадочную жидкость в вials для ВЭЖХ с микровставками.

Реактивы

Римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок (KY-RH-M20110116, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, срок годности 27.01.2016 г.); натрия гидроксид, х.ч.; натрия тетраборат, х.ч.; гексан, х.ч.; ацетонитрил, HPLC-grade (Sharlau, Испания); дансил хлорид (B2625-1G, Sigma); вода Milli-Q.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы крови (Pozis, MM-180/20/35, Россия) при температуре от –35°С до –40°С. Стандартные растворы хранили в фармацевтическом холодильнике при температуре от 2°С до 8°С (Pozis, XF-250, Россия).

Для приготовления исходного стандартного раствора римантадина 60,8 мг субстанции римантадина гидрохлорида вносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 150 мл воды Milli-Q, перемешивали до полного растворения, доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор имел концентрацию римантадина 202,08 мкг/мл. Для получения стандартного раствора с концентрацией 1010,4 нг/мл 1 мл раствора римантадина с концентрацией 202,08 мкг/мл вносили в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводили объем раствора водой Milli-Q до метки. Для получения стандартного раствора с концентрацией 808,32 нг/мл 1 мл раствора римантадина с концентрацией 202,08 мкг/мл вносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводили объем раствора водой Milli-Q до метки. Остальные стандартные растворы готовили путем разведения стандартного раствора с концентрацией 1010,4 нг/мл водой Milli-Q (Таблица 1).

| Концентрация приготовленного раствора римантадина, нг/мл | Количество компонента, мл | |
|--|---|----------------|
| | Стандартный раствор римантадина, 1010,4 нг/мл | Вода очищенная |
| 50,52 | 10 мл | до 200 мл |
| 101,04 | 10 мл | до 100 мл |
| 202,08 | 10 мл | до 50 мл |
| 404,16 | 10 мл | до 25 мл |
| 505,20 | 10 мл | до 20 мл |

Таблица 1. Приготовление стандартных растворов римантадина.

Программное обеспечение

ChemStation (ver. B.04.03).

Результаты и их обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения римантадина в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [4] и EMA [5], а также Руководства по экспертизе лекарственных средств [6] по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), перенос пробы, предел количественного определения, стабильность растворов.

Селективность

Для определения специфичности проводили анализ 6 образцов чистой плазмы, образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора римантадина в диапазоне концентраций 10,10 – 202,08 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания римантадина. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рисунках 2 и 3.

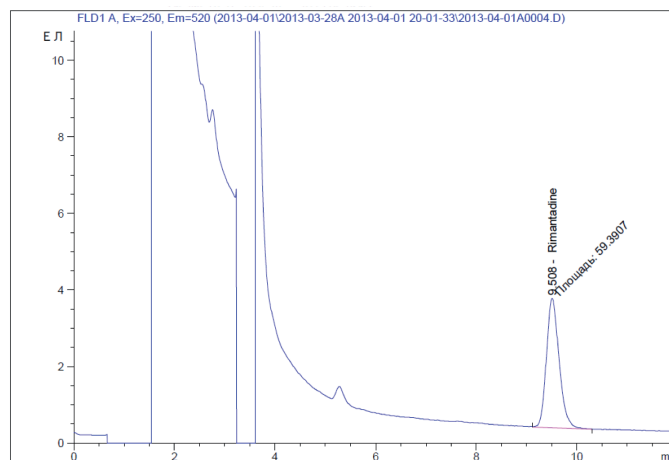


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы.

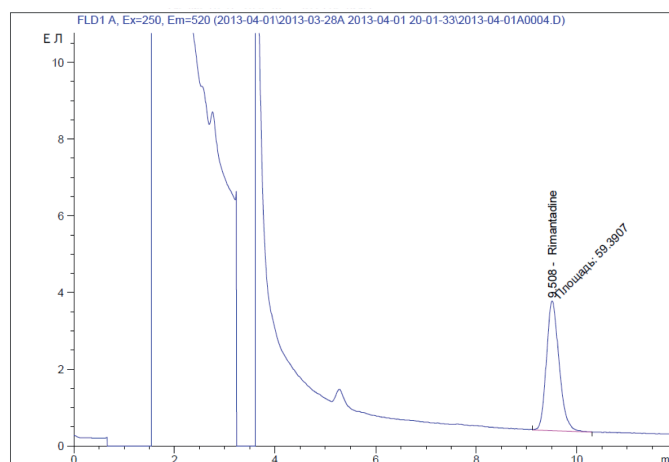


Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора римантадина (80,83 нг/мл).

Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора римантадина до получения концентраций: 10,10 нг/мл, 20,21 нг/мл, 40,42 нг/мл, 80,83 нг/мл, 101,04 нг/мл, 161,66 нг/мл,

202,08 нг/мл. По полученным значениям построены калибровочные графики ($r^2 = 0.99517$, $r^2 = 0.99698$), приведенные на Рис. 4 и 5 совместно с уравнением калибровочной кривой.

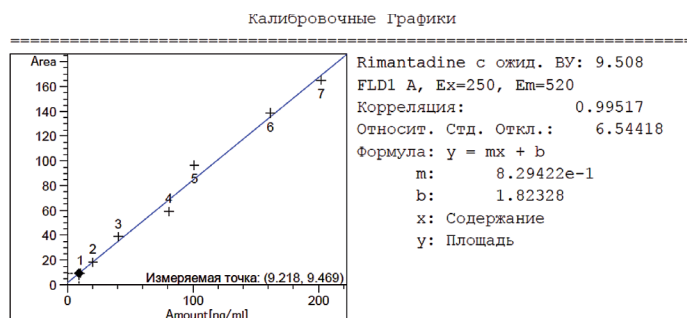


Рисунок 4. Калибровочный график №1 зависимости площади пика римантадина от его концентрации в плазме.

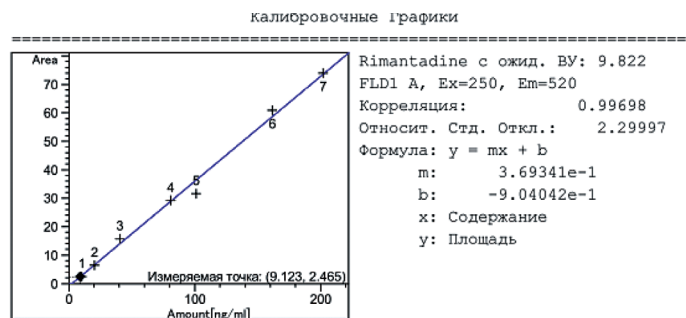


Рисунок 5. Калибровочный график №2 зависимости площади пика римантадина от его концентрации в плазме.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в Таблицах 2, 3.

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

| Код пробы | 01 pl 50,52 | 01 pl 101,04 | 01 pl 202,08 | 01 pl 404,16 | 01 pl 505,2 | 01 pl 808,32 | 01 pl 1010,4 |
|------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| $C_{\text{факт}}$, нг/мл | 10,10 | 20,21 | 40,42 | 80,83 | 101,04 | 161,66 | 202,08 |
| $C_{\text{рассчит}}$, нг/мл | 11,14 | 21,37 | 45,57 | 69,84 | 116,33 | 161,98 | 194,16 |
| ϵ , % | -7,20 | -2,24 | 9,63 | -14,15 | 12,81 | 1,98 | -2,56 |
| Норма | Не более 20 % | | Не более 15% | | | | |

Таблица 2. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

| Код пробы | 17 pl 50,52 | 17 pl 101,04 | 17 pl 202,08 | 17 pl 404,16 | 17 pl 505,2 | 17 pl 808,32 | 17 pl 1010,4 |
|------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| $C_{\text{факт}}$, нг/мл | 10,10 | 20,21 | 40,42 | 80,83 | 101,04 | 161,66 | 202,08 |
| $C_{\text{рассчит}}$, нг/мл | 6,78 | 17,74 | 44,50 | 80,22 | 86,75 | 167,30 | 203,21 |
| ϵ , % | -12,81 | -1,50 | 12,06 | 0,91 | -13,23 | 3,63 | -0,39 |
| Норма | Не более 20 % | | Не более 15% | | | | |

Таблица 3. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора римантадина до получения концентраций: 10,10 нг/мл, 80,83 нг/мл, 202,08 нг/мл. Каждый раствор хроматографировали 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 4 и 5.

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).

| Введено (нг/мл) | Найдено (нг/мл) | Найдено (нг/мл), среднее значение (n=3) | S.D. (n=3) | RSD, % (n=3) | ϵ , % |
|-----------------|-----------------|--|---------------|-----------------|-------------------|
| 10,10 | 11,14 | 9,49 | 1,50 | 15,78 | 6,01 |
| | 9,13 | | | | |
| | 8,21 | | | | |
| 80,83 | 76,02 | 83,59 | 9,22 | 11,03 | 3,41 |
| | 80,89 | | | | |
| | 93,86 | | | | |
| 202,08 | 194,16 | 203,97 | 11,17 | 5,47 | 0,94 |
| | 201,63 | | | | |
| | 216,12 | | | | |

Таблица 4. Правильность и прецизионность методики (intra-day).

| Введено (нг/мл) | Найдено (нг/мл) | Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10) | S.D. (n=10) | RSD, % (n=10) | ϵ , % |
|-----------------|-----------------|---|----------------|------------------|-------------------|
| 10,10 | 7,39 | 9,68 | 1,67 | 17,25 | 4,21 |
| | 11,32 | | | | |
| | 10,86 | | | | |
| 80,83 | 90,25 | 81,96 | 8,47 | 10,33 | 1,39 |
| | 78,84 | | | | |
| | 71,87 | | | | |
| 202,08 | 205,11 | 204,04 | 9,53 | 4,67 | 0,97 |
| | 213,70 | | | | |
| | 193,54 | | | | |

Таблица 5. Правильность и прецизионность методики (inter-day).

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли согласно на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация римантадина в плазме, для которой возможно определение римантадина со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 10,10 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 6.

Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов римантадина (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре +2+8 оС), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день), на уровнях концентраций 10,10 нг/мл и 202,08 нг/мл. Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы на уровнях концентраций 10,10 нг/мл и 202,08 нг/мл помещены в морозильник при температуре от – 35 до – 40 оС на 1 мес. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией римантадина 202,08 нг/мл и чистой плазмы на хроматограмме чистой плазмы отсутствовали пики, соответствующие римантадину. Перенос пробы отсутствовал. Соответствующая хроматограмма приведена на рисунке 7.

Заключение

Разработана методика определения римантадина в плазме крови методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектирования. Методика показала высокую чувствительность, точность и воспроизводимость. Данная методика может быть использована для количественного определения римантадина в плазме крови добровольцев для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС римантадина.

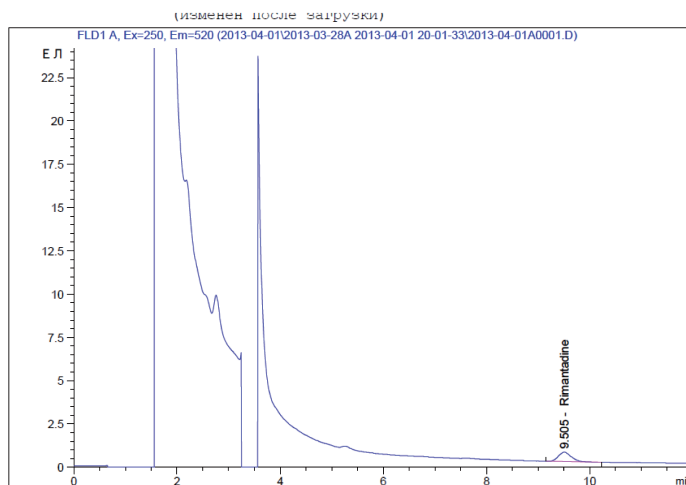


Рисунок 6. Хроматограмма чистой плазмы с содержанием перхлорона на уровне ПКО.

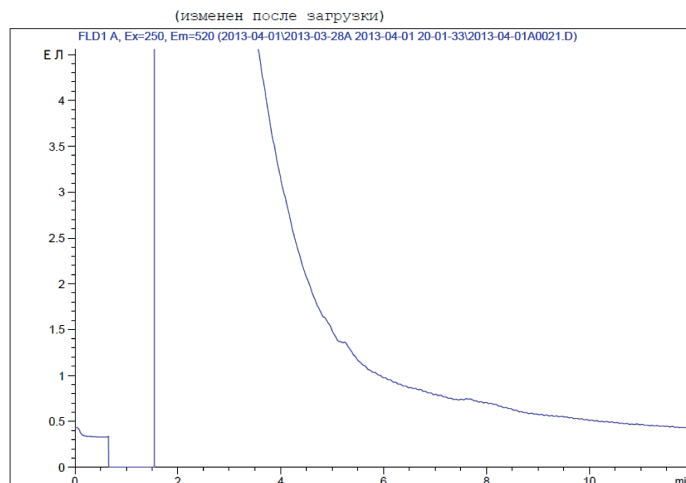


Рисунок 7. Хроматограмма чистой плазмы после ввода пробы с концентрацией римантадина 202,08 нг/мл.

Список литературы

1. Электронный справочник лекарств «Медицина от А до Я» URL: <http://www.piluli.kharkov.ua/drugs/drug/rimantadine/>
Дата обращения 23.12.2013
2. Справочник лекарств РЛС
URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1574.htm.
Дата обращения 23.12.2013
3. Государственный реестр средств измерений.
URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx.
Дата обращения 23.12.2013.
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.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Под. ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. - М.: Гриф и К, 2013. - 328 с.

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. 2014
Published in USA, April 14, 2014
5991-4224RURU

