

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ РИФАБУТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

И.Г. Кузнецова, Н.С. Дубовик,
Т.Н. Комаров, Ю.В. Медведев,
Л.А. Меньшикова,
С.Е. Северин, И.Е. Шохин,
Т.А. Ярушок

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



Разработана методика определения рифабутин - противотуберкулезного антибактериального средства широкого спектра действия, в плазме крови крыс методом ВЭЖХ с фотодиодно-матричным детектором. Пробоподготовку проводили жидкость-жидкостной экстракцией. Методика валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность. Аналитический диапазон методики составил 0,1-25 мкг/мл рифабутин в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения доклинических исследований.

Введение

По данным статистики Всемирной организации здравоохранения, несмотря на то, что в последнее десятилетие темпы роста заболеваемости туберкулезом снизились, показатели распространенности инфекции остаются высокими [1]. Кроме того, в нашей стране практически половина всех повторно зарегистрированных случаев заболевания приходится на туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью [2]. Одним из противотуберкулезных препаратов, использующихся при лечении резистентных штаммах *Mycobacterium tuberculosis*, а также в терапии заболеваний, вызванных грамположительными (*Staphylococcus* spp. *Clostridium* spp.)



и грамотрицательными (*Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*) бактериями, является рифабутин. Основной бактерицидный эффект рифабутина обусловлен способностью ингибировать ДНК-зависимую РНК-полимеразу бактериальных клеток, связываясь с β -субъединицей фермента и препятствовать инициации транскрипции. Важность и широта применения рифабутина подтверждается его включением Правительством РФ в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов» на 2013 и 2014 г [3].

Ограничивающими применение рифабутина факторами являются его малая растворимость и низкая биодоступность при пероральном приеме [4].

Преодолеть существующие недостатки становится возможным благодаря включению препарата в наноразмерную транспортную систему на основе биodeградируемых полимеров [5]. Это также обеспечит внутриклеточную доставку препарата, что важно в случае лечения туберкулеза, поскольку возбудитель локализован в фагосоме макрофагов.

Исходя из вышесказанного, существует необходимость в разработке методики количественного определения рифабутина в плазме крови с целью проведения дальнейших исследований по биораспределению рифабутина и его наноразмерных лекарственных форм.

Среди опубликованных данных о количественном определении рифабутина в плазме крови крыс приведены методы жидкостной хроматографии с УФ-детектором или диодно-матричным детектором (аналитический диапазон методик составил 10-7000 нг/мл [6]) и жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (предел количественного обнаружения для рифабутина – 60 нг/мл [7]). На основании используемых терапевтических концентраций рифабутина и приведенных в литературе аналитических диапазонов методов позволительно считать эти диапазоны подходящими для фармакокинетических исследований рифабутина.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Хроматографический анализ образцов проводили на жидкостном хроматографе Agilent серии 1200 Infinity с фотодиодноматричным детектором (Agilent Technologies, США), оснащённым бинарным насосом, автосамплером, термостатом колонок. Данные обрабатывали при помощи программного обеспечения ChemStation (Agilent Technologies, США).

Для пробоподготовки использовали шейкер типа “вортекс” Heidolph Reax Top (Германия), испаритель под током азота Thermo Reacti-Therm (США), шейкер “Biosan” (Латвия), центрифугу Thermo Scientific SL16, EC; взятие навески осуществляли с помощью весов A&D GR-200 (Япония); реактивы и биоматериал по объёму дозировали с помощью дозаторов Ленпипет Лайт 100-1000, 20-200 и 10-100 мкл.

В работе использовали следующие реактивы: субстанция рифабутин (Taizhou Tianrui Chempharm Co., Ltd.); метанол (gradient grade, Scharlau); бутилгидрокситолуол (х.ч. Scharlau), ацетонитрил (Scharlau), гексан (Scharlau), этилацетат (Scharlau), воду очищенную.

Образцы нативной и исследуемой плазмы хранили в морозильнике при температуре от -45 до -50 °С. Стандартные растворы хранили в фармацевтическом холодильнике при температуре от 2 до 8 °С. Исходный раствор рифабутина готовили путем растворения навески стандарта в метаноле. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора метанолом.

Подготовка плазмы крови к анализу осуществлялась жидкость-жидкостной экстракцией в смесь гексан: этилацетат (80:20). Для проведения пробоподготовки к 500 мкл плазмы крови прибавляли 2,5 мл смеси гексан: этилацетат (80:20), перемешивали на вортексе в течение 30 секунд и затем центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Органический слой отделяли. Процедуру экстракции повторяли еще раз. Органический слой переносили в пробирки для испарителя и упаривали под током азота при 43 °С досуха. Получившийся сухой остаток перерастворяли в 100 мкл ацетонитрила и переносили надосадочную жидкость в хроматографические пробирки [6].

Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6x150 мм, 5 мкм с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6x12,5 мм, 5 мкм при 40 °С.

В качестве подвижной фазы использовали 0,05М ацетатный буферный раствор pH 4,5 — ацетонитрил 52:48. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; объем вводимой пробы 5 мкл. Детектировали при длине волны 278 ± 4 нм с записью спектра в диапазоне 200-400 нм. Время хроматографирования одной пробы составило 10 мин; время выхода рифабутина - около 6,3 мин.

Результаты и их обсуждение

Валидацию методики определения рифабутина в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [8,9], а также Руководству по экспертизе лекарственных средств под ред. проф. А. Н. Миронова (ФГБУ «НЦ ЭСПП», 2013) [10].

Селективность

Анализировали 6 образцов чистой плазмы, образцы чистой плазмы с добавлением стандартных растворов рифабутина в концентрациях 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2,5; 10 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания рифабутина (рисунок 1).

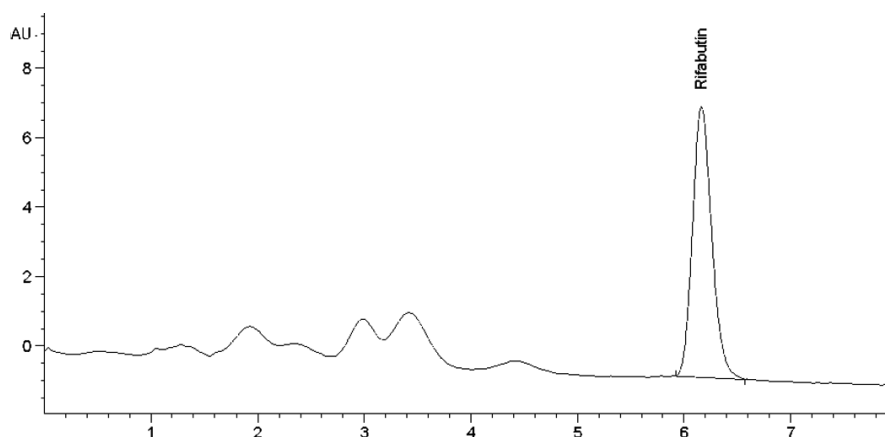


Рисунок 1. Хроматограмма нативной плазмы с добавлением стандартного раствора рифабутина (1 мкг/мл).

Линейность

Линейность методики оценивалась по 5 калибровочным стандартам (0,1; 0,5; 1; 2,5; 10 мкг/мл). В изучаемом диапазоне концентраций (C) отмечена линейная зависимость между концентрацией анализируемого соединения и соответствующей площадью пика. По полученным значениям построен калибровочный график, коэффициент корреляции составил 0.99991 (рисунок 2).

Отклонения концентраций калибровочных растворов для первой точки составило не более 20% и не более 15% для последующих точек.

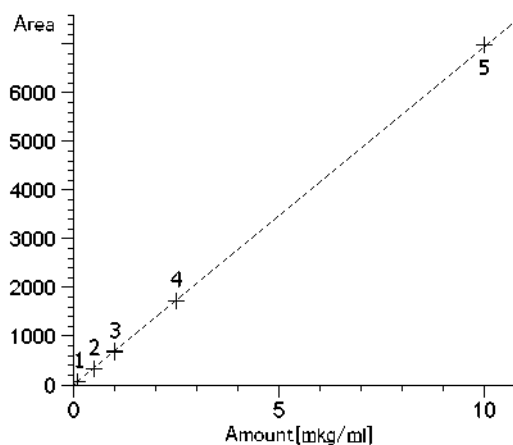


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости площади пика рифабутина от его концентрации в плазме.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности для всех растворов, проанализированных в ходе установления линейности, рассчитывали величины степени экстракции (%) и относительной погрешности (ε, %) по формулам:

$$1. \text{ степень экстракции} = \frac{100 \cdot C_{\text{изм}}}{C_{\text{теор}}}$$

$$2. \quad \varepsilon = \frac{100 \cdot (C_{\text{изм}} - C_{\text{теор}})}{C_{\text{теор}}}$$

$$3. \quad C_{\text{изм}} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{n}$$

где Сизм — среднее значение измеренного количества рифабутина, рассчитанное по трем повторениям (мкг/мл), Стеор — внесенное количество рифабутина (мкг/мл), Сi — количество рифабутина, рассчитанное по уравнению линейной регрессии.

Также рассчитывали величину относительного стандартного отклонения значений измеренной концентрации аналита (RSD, %) [11].

Полученные результаты представлены в таблице

Внесенное количество, мкг/мл	Измеренное количество, мкг/мл	Среднее значение измеренного количества, мкг/мл	SD (n=3)	степень экстракции, %	ε, %	RSD, %
0,1	0,102	0,101	0,001	101	0,92	1,0
	0,101					
	0,100					
0,5	0,47	0,47	0,02	94	-6	4,26
	0,49					
	0,45					
1	0,99	0,99	0,03	99	-1	3,03
	1,02					
	0,96					
2,5	2,52	2,487	0,03	99,48	-0,52	1,41
	2,49					
	2,45					
10	10,19	10,01	0,19	100,1	0,1	1,91
	10,03					
	9,81					

Таблица 1. Правильность и прецизионность методики.

Предел количественного определения

Пределом количественного определения методики минимальное количество рифабутина, которое может быть

количественно определено с помощью данной методики. ПКО методики составил 0,1 мкг/мл.

Заключение

Разработана методика количественного определения рифабутина в плазме крови крыс методом ВЭЖХ с применением фотодиодноматричного детектора при длине волны 278 ± 4 нм. Данная методика обладает достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения концентраций препаратов в плазме крови. Методика была валидирована по основным параметрам в соответствии с требованиями руководства для предприятий [11].

Список литературы

1. <http://www.who.int/gho/tb/en/>
2. <http://goo.gl/QYbn9Y>
3. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) на **2012** г. Утв. распоряжением Правительства РФ от 19.12.**2013** N 2427-р
4. Skinner M. H., Hsieh M., Torseth J. et al. Pharmacokinetics of rifabutin// Antimicrob. Agents Chemother, **1989**, V. 33. P. 1237–1241
5. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles/ Nagavarma B.V.N., Hemant K., Yadav S., Ayaz A., Vasudha L.S., Shivakumar H.G., // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. **2012**, V. 5. P. 16-23.
6. A hand-held apparatus for “nose only” exposure of mice to inhalable microparticles as a drypowder inhalation targeting lung and airway macrophages/ Kaur J., Muttill P, Verma RK, Kumar K, Yadav AB, Sharma R, Misra A.// Eur J Pharm Sci. **2008** Aug 7; 34(4-5):351
7. In vivo disposition and metabolism by liver and enterocyte microsomes of the antitubercular drug rifabutin in rats / Koudriakova T., Iatsimirskaia E., Tulebaev S., Spetie D., Utkin I., Mullet D., Thompson T., Vouros P., Gerber N. // J Pharmacol Exp Ther. **1996** Dec; 279(3):1300-9.
8. 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**.
9. Guideline on Validation of Bioanalytical Methods (draft) / London: EMA. Committee for medicinal products for human use, **2009**.
10. Руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Гриф и К, **2013**.
11. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности/ методические рекомендации. М.: — Издательство «Спорт и Культура - 2000», **2007**. 192 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. 2015
Published in USA, March 17, 2015
5991-5611RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies