

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

БИОАНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЛЬБУТАМОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

Болдина Ю.Е., Комаров Т.Н.,
Мидруев Е.Ю., Шохин И.Е.,
Меньшикова Л.А., Медведев
Ю.В., Коновалова О.А.,
Рыженкова А.П.

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



Разработана методика определения препаратов сальбутамола в плазме крови человека методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Пробоподготовку проводили путем осаждения белков раствором трифторуксусной кислоты. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов. Аналитический диапазон методики составил 2–100 нг/мл в плазме крови. Разработанная методика позволяет проводить определение концентрации сальбутамола в крови пациентов на фоне приема других препаратов и может быть применена как для фармакокинетических исследований препаратов сальбутамола в различных лекарственных формах.

Введение

Сальбутамол относится к классу β -адреномиметиков с преимущественным влиянием на β_2 -адренорецепторы (локализирующиеся, в частности, в бронхах, миометрии, кровеносных сосудах). Предупреждает и купирует бронхоспазм; снижает сопротивление в дыхательных путях, увеличивает жизненную емкость легких. Предотвращает выделение гистамина, медленно реагирующей субстанции из тучных клеток и факторов хемотаксиса нейтрофилов. По сравнению с другими препаратами этой группы оказывает менее выраженное положительное хроно- и инотропное влияние на миокард. Вызывает расширение коронарных артерий, практически не снижает артериальное давление. Оказывает токолитическое действие, понижая тонус и сократительную активность миометрии.



После приема внутрь сальбутамол хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта. Связывание с белками плазмы составляет 10% [1]. Метаболизируется при "первом прохождении" через печень и, возможно, в стенке кишечника; основной метаболит - неактивный сульфатный конъюгат. Сальбутамол не метаболизируется в легких, таким образом его конечный метаболизм и выведение после ингаляции зависит от способа применения, который определяет соотношение между вдыхаемым и ненамеренно проглоченным сальбутамолом, что позволяет применять сальбутамол ингаляционно во избежание проявления системного действия.

T_{1/2} из плазмы крови составляет 2-7 ч. Сальбутамол быстро выводится с мочой в виде метаболитов и неизмененного вещества; в небольших количествах выводится с калом.

Сальбутамол (Salbutamolium) по своей структуре является производным фенола.

Химическое название: α1-[[[(1,1-Диметилэтил) амино] метил]-4-гидрокси-1,3-бензолдиметанол (и в виде сульфата или гемисукцината).

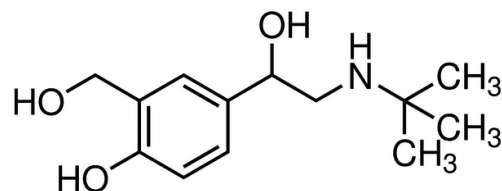


Рисунок 1. Структурная формула сальбутамола.

ИЮПАК: 4 - [2 - (трет-бутиламино)-1-гидроксиэтил] -2 - (гидроксиметил) фенол. Сальбутамола гидрохлорид — белый кристаллический порошок без запаха. Легко растворим в воде (1:4), мало растворим в этаноле, хлороформе и эфире [2].

Среди опубликованных методов количественного определения сальбутамола в плазме крови приведены методы жидкостной хроматографии с флюориметрическим детектированием [3-5], ВЭЖХ с масс-селективным детектированием [6] и ВЭЖХ с кондуктометрическим детектированием [7]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований препаратов сальбутамола.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Оборудование

Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Agilent 1260 оснащенном четырехканальным градиентным насосом, автосамплером, термостатом колонок и образцов и флуориметрическим детектором под управлением программного обеспечения ChemStation (ver. B.04.03).

Для пробоподготовки применяли вортекс-шейкер Reax top (Heidolph, Германия), центрифугу SL 16 (Thermo Scientific, США). Определение pH проводилось на портативном pH-метре 728 pH lab (Metrohm AG, Швейцария). Взятие навесок осуществляли на аналитических весах (OHAUS DV 214C, Китай). Дозирование плазмы по объему осуществляли при помощи дозаторов переменного объема Ленпипет Дигитал 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл, (Россия).

Растворы и реактивы

Сальбутамола гидрохлорид, субстанция-порошок (99,5% основного вещества); трифторуксусная кислота (х.ч.); ацетонитрил (gradient grade, Scharlau); 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°C до -40°C . Стандартные растворы хранили в фармацевтическом холодильнике при температуре от 2°C до 8°C (Pozis, XF-250, Россия).

Для приготовления исходного стандартного раствора сальбутамола 58,0 мг субстанции вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 25 мл воды очищенной, перемешивали до полного растворения, доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор имел концентрацию сальбутамола 1001 мкг/мл (раствор А). Для получения раствора сальбутамола с концентрацией 5,005 мкг/мл отбирали 1 мл раствора А в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл воды очищенной, перемешивали до полного растворения, доводили объем раствора тем же растворителем до метки (раствор Б). Стандартные растворы готовили путем разведения раствора Б водой очищенной (Таблица 1).

Концентрация приготовленного раствора сальбутамола, нг/мл	Количество компонента, мл	
	Стандартный раствор сальбутамола, С = 5005 нг/мл	Вода очищенная
500	10 мл	До 100 мл
250	5 мл	До 100 мл
125	2,5 мл	До 100 мл
100	2 мл	До 100 мл
50	1 мл	До 100 мл
25	1 мл	До 200 мл

Таблица 1. Приготовление стандартных растворов сальбутамола.

Для приготовления раствора сальбутамола с концентрацией 10 нг/мл отбирали 10 мл раствора сальбутамола с концентрацией 50 нг/мл в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой очищенной до метки, перемешивали.

Пробоподготовка

К 600 мкл плазмы крови прибавляли 200 мкл 75% раствора трифторуксусной кислоты, встряхивали на шейкере в течение 20 с, далее центрифугировали в течении 10 мин при 15200 об/мин и переносили 600 мкл надосадочной жидкости в вials для хроматографа.

Хроматографирование

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, флуоресцентным детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США.

Подвижная фаза: водный раствор трифторуксусной кислоты с pH 2,5 (А) / ацетонитрил (В) (градиентное элюирование,

таблица 2), предварительно профильтрованная и дегазированная на устройстве для фильтрации под вакуумом.

Время, мин	Количество компонента, %	
	А	В
0	92	8
9	92	8
9,5	50	50
12	50	50
12,5	92	8
17	92	8

Таблица 2. Схема градиентного элюирования.

Результаты и их обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения сальбутамола в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [8] и EMA [9], а также Руководства по экспертизе лекарственных средств [10] по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), перенос пробы, предел количественного определения, стабильность растворов.

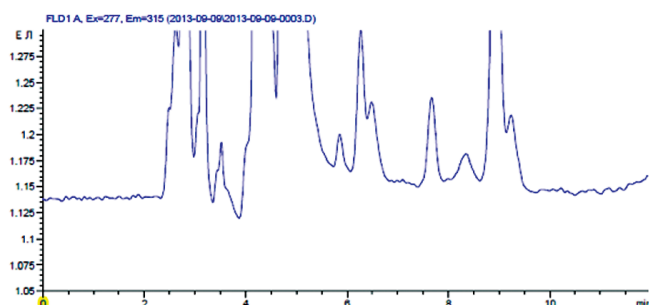


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы.

Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с добавлением стандартного раствора сальбутамола до получения концентраций: 2,0 нг/мл, 5,0 нг/мл, 10,0 нг/мл, 20,0 нг/мл,

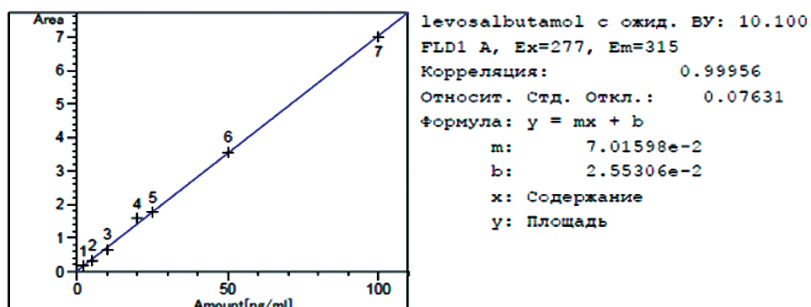


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости площади пика сальбутамола от его концентрации в плазме.

Скорость потока подвижной фазы: 1 мл/мин.
 Неподвижная фаза: хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C18 250x4,6мм 5 мкм с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5x4,6мм 5 мкм, при температуре 25 °С.
 Объем вводимой пробы: 50 мкл.
 Время хроматографирования: 17 мин.
 Детектирование: возбуждение 277 нм, эмиссия 315 нм.
 Время удерживания: сальбутамола – около 10,1 мин.

Селективность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы, образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора сальбутамола в диапазоне концентраций 2–100 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания сальбутамола. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рисунках 2 и 3.

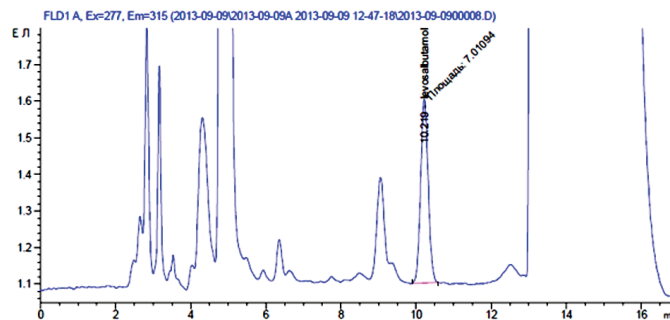


Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора сальбутамола (20 нг/мл).

25,0 нг/мл, 50,0 нг/мл, 100,0 нг/мл. По полученным значениям, был построен калибровочный график ($r^2 > 0,9996$), приведенный на рисунке 4.

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

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

Код пробы	salb-1 10	salb-1 25	salb-1 50	salb-1 100	salb-1 125	salb-1 250	salb-1 500
$C_{\text{факт}}$, нг/мл	2,0	5,0	10,0	20,0	25,0	50,0	100,0
$C_{\text{рассчит}}$, нг/мл	2,1	4,3	9,0	22,3	24,9	50,3	99,6
ϵ , %	5	14,0	10,0	11,5	0,4	0,6	0,4
Норма	Не более 20 %	Не более 15%					

Таблица 3. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 5 образцов одной концентрации, для не менее, чем 4 концентраций: 2,0 нг/мл, 10,0 нг/мл, 25,0 нг/мл, 100,0 нг/мл. Для полученных значений концентраций

были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (RME, %), приведенные в таблицах 4 и 5.

Прецизионность и правильность (intra-day).						
код пробы	введено (нг/мл)	найдено (нг/мл)	найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	RME, %
salb-1 10	2,0	2,1	2,04	0,29	14,12	2,00
		2,4				
		1,8				
		1,7				
		2,2				
salb-1 50	10,0	9,0	9,84	0,54	5,50	1,60
		10,4				
		10,2				
		9,7				
		9,9				
salb-1 125	25,0	24,9	23,72	0,86	3,63	5,12
		22,9				
		22,9				
		24,2				
		23,7				
salb-1 500	100,0	99,6	98,48	0,94	0,95	1,52
		98,6				
		98,7				
		97,0				
		98,5				

Таблица 4.

Прецизионность и правильность (inter-day).						
код пробы	введено (нг/мл)	найдено (нг/мл)	найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	RME, %
salb-2 10	2,0	2,2	2,01	0,23	11,59	0,50
		2,0				
		1,7				
		1,9				
		2,1				
salb-2 50	10,0	10,3	9,73	0,56	5,79	2,70
		9,9				
		9,9				
		8,7				
		9,3				
salb-2 125	25,0	25,5	24,11	0,89	3,69	3,56
		25,2				
		24,2				
		23,6				
		24,0				
salb-2 500	100,0	100,3	99,46	1,22	1,23	0,54
		100,0				
		100,5				
		100,6				
		100,8				

Таблица 5.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD) и относительной погрешности (RME) соответствуют нормам (не более 20 % минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных концентраций).

Предел количественного определения.

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных правильности и прецизионности. Предел количественного определения методики составил 2 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая предел количественного определения методики, приведена на рис. 5.

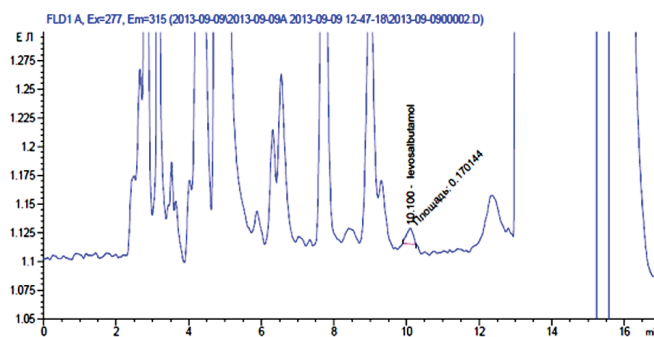


Рисунок 5. Хроматограмма плазмы крови с содержанием сальбутамола на уровне ПКО.

Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов сальбутамола (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре от 2 до 8 °С), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 и 48 ч при анализе на следующий день при температуре 15 °С), на уровнях концентрации 100 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %. Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы на уровне концентрации 100 нг/мл помещены в морозильник при температуре от – 35 до – 40 °С для последующего анализа спустя 6 мес после заморозки.

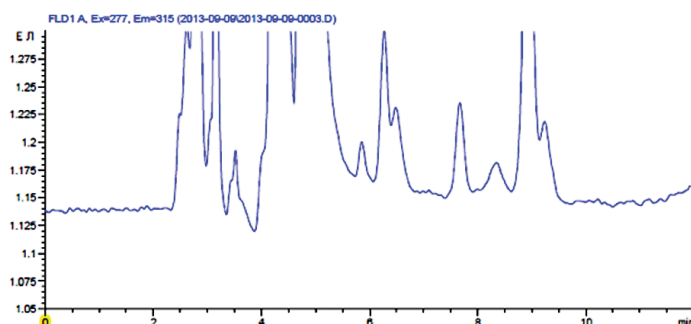


Рисунок б. Хроматограмма чистой плазмы после ввода пробы с концентрацией сальбутамола 100 нг/мл.

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией сальбутамола 100 нг/мл и чистой плазмы на хроматограмме чистой плазмы отсутствовали пики, соответствующие сальбутамолу. Перенос пробы отсутствовал.

Заключение

Разработана методика определения сальбутамола в плазме крови методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Методика показала высокую чувствительность, точность и воспроизводимость. Данная методика может быть использована для количественного определения сальбутамола в плазме крови добровольцев для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС сальбутамола в различных лекарственных формах (таблетки, дозированные аэрозоли).

Список литературы

1. Лекарственные препараты в России: Справочник Видаль. М.: АстраФармСервис, **2007**. 1632 с.
2. DrugBank. <http://www.drugbank.ca/> (Дата обращения 20.03.**2014**).
3. David W. Boulton, J. Paul Fawcett. Determination of salbutamol enantiomers in human plasma and urine by chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 672 (**1995**) 103-109.
4. Mark J. Hutchings, John D. Paull, Denis J. Morgan. Determination of salbutamol in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 277 (**1983**) 423-426.
5. Y.M. Koh, M.I. Saleh, S.C. Tan. Selective extraction of salbutamol from human plasma with the use of phenylboronic acid. *Journal of Chromatography A*. 987 (**2003**) 257-267.
6. K Schmeer, T Sauter, J Schmid. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 777 (**1997**) 67-72.
7. Jin Ouyang, Jing Li Duan, Willy R.G. Baeyens, Joris R. Delanghe. A simple method for the study of salbutamol pharmacokinetics by ion chromatography with direct conductivity detection. *Talanta*. 65 (**2005**) 1-6.
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, September **2013**
9. Guideline on bioanalytical method validation (European medicines agency). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP), London, July **2011**
10. 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. 2015
Published in USA, March 27, 2015
5991-5612RURU

