

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

Г. В. Раменская,
И. Е. Шохин, Т. Н. Комаров,
Ю. В. Медведев,
К. В. Козадаева,
Ю. Е. Болдина, А. А. Львова,
Е. Ю. Мидруев,
Л. А. Меньшикова.

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



В данной статье описана разработанная и валидированная методика определения одной из форм витамина В6 пиридоксина, принимаемого внутрь в виде различных лекарственных форм, а также поступающего в организм с пищей. Количественное определение пиридоксина в плазме крови проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с фотодиодным детектором. Пробоподготовка осуществлялась с помощью осаждения белков раствором трифторуксусной кислоты. Биоаналитическая методика была валидирована в соответствии с Руководством по экспертизе лекарственных средств (Россия), Руководствами FDA, EMA. Аналитический диапазон данной методики составляет 5-250 нг/мл, что позволяет применять методику для проведения фармакокинетических исследований, мониторинга исходного уровня витамина в организме человека с целью диагностики витаминodefицитов.

Введение

Витамины - низкомолекулярные биологически активные органические соединения различной химической природы, необходимые в небольших количествах организму для нормального функционирования и роста, сопротивляемости инфекциям, синтеза белков и жиров.

В настоящее время, согласно официальной статистике ВОЗ, витаминodefициты (гипо- и авитаминозы) встречаются повсеместно у большинства людей¹. Витаминodefициты сопровождаются различными нарушениями в функционировании нервной системы, желудочно-кишечного тракта, нарушениями метаболизма и другими симптомами.



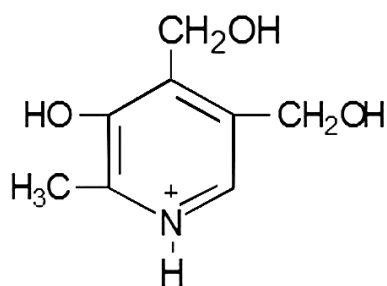


Рисунок 1. Структурная формула пиридоксина

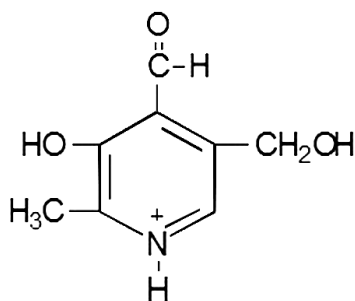


Рисунок 2. Структурная формула пиридоксала

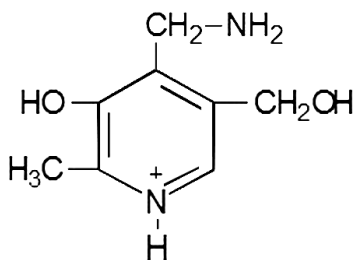


Рисунок 3. Структурная формула пиридоксамин

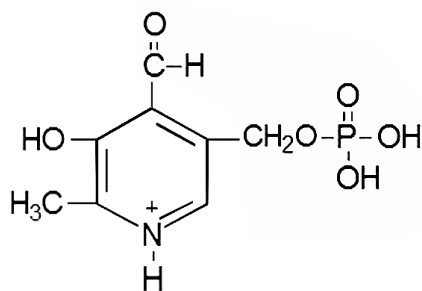


Рисунок 4. Структурная формула пиридоксальфосфата

Одним из наиболее важных витаминов для человека является витамин В6. В пищевых продуктах витамин В6 наиболее часто встречается в виде пиридоксина (рис. 1).

Кроме пиридоксина, витамин В6 существует в виде пиридоксала, пиридитола, пиридоксамин, и других форм, образующихся также в организме в процессе метаболизма, представленных на Рис. 2-4.

Ключевая роль витамина В6 в организме человека заключается в участии его коферментной формы пиридоксальфосфата в реакции трансаминирования аминокислот. В организм человека витамин В6 поступает с пищей и в виде лекарственных средств и биологически активных добавок к пище. В качестве лекарственного средства для внутреннего применения витамин В6 используется в виде пиридоксина, что обусловлено наибольшей устойчивостью именно этой формы витамина в кислой среде желудка.

Всасывается быстро на всем протяжении тонкого кишечника, большее количество абсорбируется в тощей кишке. Метаболизируется в печени с образованием фармакологически активных метаболитов (пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат). Пиридоксальфосфат с белками плазмы связывается на 90%. Хорошо проникает во все ткани; накапливается преимущественно в печени, меньше - в мышцах и ЦНС. Проникает через плаценту, секретируется с грудным молоком. T1/2 - 15-20 дней. Выводится почками в виде 4-пиридоксильной кислоты (при в/в введении - с желчью 2%), а также в ходе гемодиализа².

Тем не менее, учитывая вышеизложенное, именно мониторинг уровня пиридоксина в плазме крови используется с целью диагностики гиповитаминозов витамина В6³. Кроме того, пиридоксин входит в состав многих комплексных витаминных препаратов, таких как, например, оригинальный препарат Магне В6[®], в состав которого входит пиридоксин и соль магния. Основная роль пиридоксина в данном и аналогичных препаратах заключается в повышении всасываемости и усвояемости магния, однако, вместе с тем, пиридоксин, являясь активной фармацевтической субстанцией также определяет системное действие подобных препаратов. В настоящее время как в Российской Федерации, так и за её пределами, ведётся активная разработка современных витаминных и поливитаминных препаратов, что делает необходимым разработку методики для количественного определения пиридоксина в плазме крови человека, обладающую достаточной чувствительностью, воспроизводимостью и точностью, а также простотой в применении, как для проведения качественной диагностики и терапевтического мониторинга уровня витамина В6 в крови человека, так и для проведения фармакокинетических исследований⁴⁻⁶.

Для количественного определения пиридоксина в плазме крови описаны методы ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием после проведения твердофазной экстракции (предел количественного определения – 25 нг/мл)⁷, осаждения белков метанолом (предел количественного определения – 50 нг/мл)⁸, ВЭЖХ с масс-селективным детектированием, метод пробоподготовки - осаждение белков (предел количественного обнаружения – 1 нг/мл)⁹. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований препаратов пиридоксина. В качестве пробоподготовки применяют методы жидкость-жидкостной экстракции, твердофазной экстракции и осаждение белков. Для проведения настоящего исследования был выбран метод ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием после осаждения белков.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Селективность

Хроматографический анализ образцов проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 с фотодиодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США), автосамплером и термостатом колонок. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation (ver. B.04.03) (Agilent Technologies, США).

Для пробоподготовки использовали шейкер типа “вортекс” Heidolph Reax Top (Германия); ультрацентрифугу Thermo Scientific SL16 с ротором-насадкой на микропробирки, объемом 1.5-2.0 мл (ЕС). Взятие навесок осуществляли с помощью весов A&D GR-200 (Япония). Определение pH буферных растворов проводили при помощи портативного pH-метра 728 pH lab, Metrohm AG (Швейцария). Дозирование реактивов и биоматериала по объёму осуществляли с помощью дозаторов Ленпипет Лайт 100-1000 мкл, 20-200 мкл и 10-100 мкл. Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке¹⁰.

Растворы и реактивы

Пиридоксина гидрохлорид, субстанция-порошок (годен до 07.2015); ацетонитрил (gradient grade, Scharlau, Испания); трифторуксусная кислота (extra pure, Scharlau, Испания); вода Milli-Q.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре от – 45 до – 50 °С. Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С.

Исходный раствор пиридоксина готовили путём растворения навески стандарта в подготовленной воде

и хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора водой.

Пробоподготовка

В качестве способа пробоподготовки для плазмы крови был выбран метод осаждения белков 75% раствором трифторуксусной кислоты. Данный метод позволяет получать достаточно чистые пробы за счёт высокой осаждающей способности растворов трифторуксусной кислоты, что в сочетании с быстротой и простотой данного метода в исполнении позволяет применять его для проведения анализа большого количества образцов, при проведении фармакокинетических исследований, в том числе исследований биоэквивалентности воспроизведённых лекарственных средств. Для проведения пробоподготовки к 600 мкл плазмы крови (либо к 480 мкл плазмы с прибавлением 120 мкл раствора стандартного образца) прибавляли 200 мкл 75% раствора трифторуксусной кислоты, встряхивали на вортекс-шейкере, далее центрифугировали в течение 10 мин при 15200 об/мин, после чего 600 мкл надосадочной жидкости переносили в микроials для хроматографа.

Хроматографический анализ

Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 150*4,6 мм 5 мкм с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18 12.5*4.6 мм 5 мкм, при температуре 25 °С.

В качестве подвижной фазы использовали подготовленную воду, подкисленную трифторуксусной кислотой (компонент А), предварительно профильтрованную через мембранный фильтр и дегазированную на устройстве для фильтрации под вакуумом, и ацетонитрил для ВЭЖХ (компонент В). Для анализа использовалось градиентное элюирование по схеме, представленной в Таблице 1.

Время, мин	Количество компонента, %	
	А	В
0	99	1
6.5	99	1
7.0	60	40
10.0	60	40
10.5	99	1
15	99	1

Таблица 1. Схема градиентного элюирования.

Скорость потока подвижной фазы: 1 мл/мин.

Объем вводимой пробы — 100 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 290 нм $\pm$ 4 нм, с записью спектра в диапазоне 200-400 нм. Время хроматографирования одной пробы — 15 мин, время удерживания пиридоксина — около 6 мин.

Результаты и их обсуждение

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили согласно стандартной операционной процедуре исследовательской лаборатории, подготовленной на основе Руководства по экспертизе лекарственных средств, том I (Россия), а также Руководств FDA (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) и EMA (Guideline on validation of bioanalytical methods.

European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2012) по следующим характеристикам 11-13. селективность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного обнаружения, стабильность проб.

Селективность

Для определения селективности был проведён анализ 7 образцов чистой плазмы, образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора пиридоксина в диапазоне концентраций 5 нг/мл — 250 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания пиридоксина. Образцы биологической матрицы (плазмы крови человека), используемые для проведения процедуры валидации, были получены от 6-ти различных источников. Хроматограммы, демонстрирующие селективность, приведены ниже на Рисунках 5 и 6:

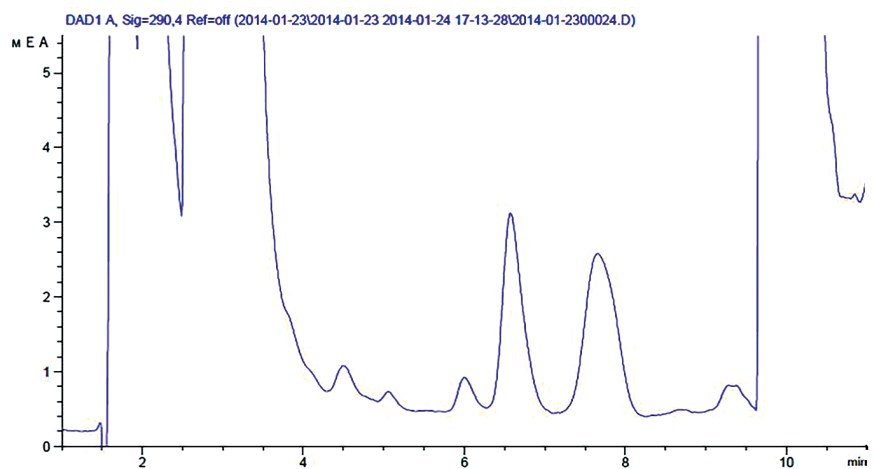


Рисунок 5. Хроматограмма чистой плазмы.

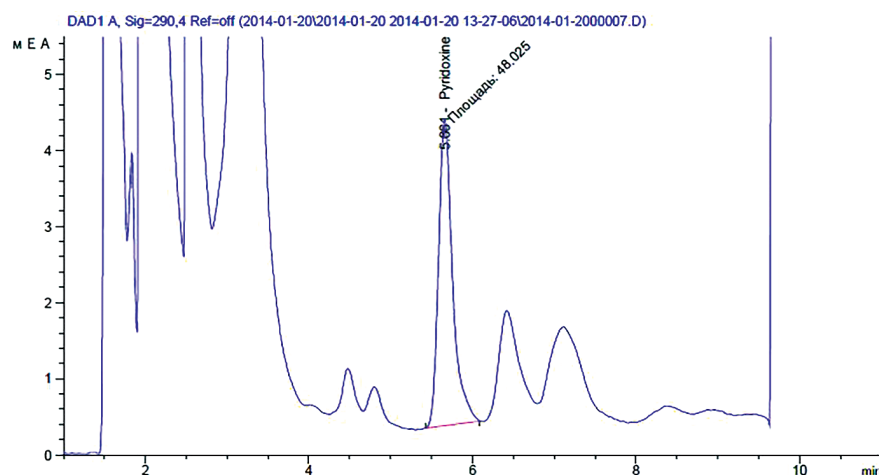


Рисунок 6. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора пиридоксина (200 нг/мл).

Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки число теоретических тарелок составила 9400 теоретических тарелок; фактор симметрии для пика пиридоксина – 0.82.

Линейность

Был проведён анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора пиридоксина до получения концентраций: 5.0 нг/мл; 10.0 нг/мл; 25.0 нг/мл; 50.0 нг/мл; 100.0 нг/мл; 200.0 нг/мл и 250.0 нг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ($r^2 = 0.9996$), приведенный на Рис. 7.

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

$C_{\text{факт}}, \text{нг/мл}$	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0	200.0	250.0
$C_{\text{рассчит}}, \text{нг/мл}$	4.76	9.72	24.46	18.60	97.00	204.0	242.02
$\epsilon, \%$	6.85	3.31	2.29	3.74	3.05	2.01	0.71
Норма	Не более 20 %		Не более 15%				

Таблица 2. 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

Был проведён анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора пиридоксина до получения концентраций: 5.0 нг/мл, 10.0 нг/мл, 100.0 нг/мл, 250.0 нг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. 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 3 и 4.

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация пиридоксина в плазме, для которой возможно определение препарата со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения для пиридоксина составил 5 нг/мл.

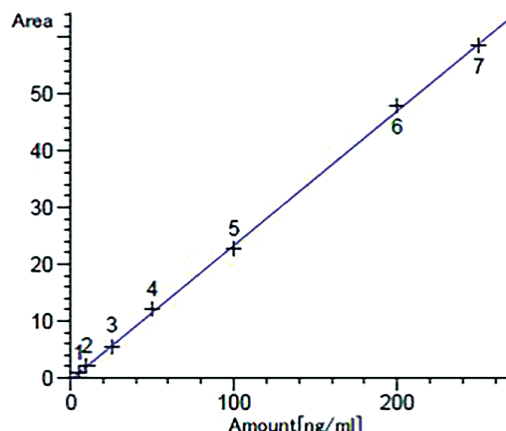


Рисунок 7. Калибровочный график зависимости площади пика пиридоксина от его концентрации в плазме.

Перенос пробы

В соответствии с нормами Руководства EMA и Руководства по экспертизе лекарственных средств для вещества, содержащегося в плазме крови человека в норме, оценка переноса пробы не проводится.

Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартного раствора пиридоксина (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре -80 °C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 10 °C), на уровнях концентраций 5 нг/мл и 250 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла замораживания-размораживания. Площадь пиков при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы на уровнях концентраций 5 нг/мл и 250 нг/мл помещены в морозильник при температуре -80 °C на 1 мес. Площадь пиков при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Все исследования стабильности проводились в трех аликвотах.

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение	S.D.	RSD, %	€, %
5.0	2.21	2.278	0.05	2.31	14.47
	2.29				
	2.24				
	2.34				
	2.31				
10.0	9.65	10.528	1.31	12.48	5.49
	10.98				
	11.11				
	12.12				
	8.78				
100.0	45.20	48.028	3.52	7.33	3.81
	51.79				
	47.25				
	51.61				
	44.29				
250.0	258.37	250.0	258.37	252.03	26.01
	227.18				
	222.32				
	277.36				
	274.94				

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики (intra-day).

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение	S.D.	RSD, %	€, %
5.0	2.13	2.12	0.19	9.13	6.68
	1.96				
	2.00				
	1.73				
	2.02				
25.0	8.86	10.00	1.14	11.38	0.19
	9.82				
	9.52				
	8.73				
	10.42				
100.0	47.19	47.31	3.10	6.54	5.24
	51.21				
	44.58				
	45.66				
	44.35				
250.0	249.34	239.66	23.25	9.70	4.00
	219.62				
	223.98				
	223.95				
	219.52				

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

Заключение

Была разработана методика количественного определения пиридоксина в плазме крови методом ВЭЖХ с фотодиодноматричным детектором, обладающая достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения концентраций препаратов в плазме крови с целью проведения фармакокинетических исследований и диагностики витаминodefицитов. Методика была валидирована по показателям селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения, стабильность.

Список литературы

1. URL: <http://www.who.int/gho/en/>
2. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. URL: www.grls.rosminzdrav.ru/
3. R. Percudani, A. Peracchi, BMC Bioinformatics, **2009**, 10, 273.
4. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) на 2015 год. Утвержден Распоряжением Правительства РФ №2782-р от 30 декабря **2014** г.
5. Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Утвержден Распоряжением Правительства РФ №1141-р от 6 июля **2010** г.
6. Приказ «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года». Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. — М., **2009** г.
7. K. Li, Biomed. Chromatogr., **2002**, 16, 504–507.
8. А.В. Зыков, Я.И. Коренман, Тез. докл. VI Всерос. конф. с междунар. участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012), **2012**, ч. 4, 316.
9. Ø. Midttuna, S. Hustad, E. Solheim, J. Schneede, P.M. Ueland, Clinical Chemistry, **2005**, 51 № 7, 1206-1216.
10. Государственный реестр средств измерений. URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx
11. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Часть I, под ред. А.Н. Миронова, Гриф и К, Москва, **2013**, 328.
12. 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**.
13. Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London, **2011**.

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, April 1, 2015
5991-5929RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies