

Ю.В. Медведев,
ассистент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова; сотрудник ООО «Технология
лекарств»

Г.В. Раменская,
д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой
фармацевтической химии с курсом токсикологической
химии, директор НИИ фармации Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова

И.Е. Шохин,
к.фарм.н., ассистент кафедры фармацевтической
химии с курсом токсикологической химии
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова;
сотрудник ООО «Технология лекарств»

Т.А. Ярушок,
аспирант кафедры фармацевтической химии
с курсом токсикологической химии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова; сотрудник
ООО «Технология лекарств»

М.А. Шевелева,
к.фарм.н., ассистент кафедры фармацевтической
химии с курсом токсикологической химии
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Yu.V. Medvedev,
assistant of the chair of pharmaceutical chemistry with
a course of toxicological chemistry
of the First MSMU named after I.M. Sechenov

G.V. Ramenskaya,
Doctor of pharmacy, prof., head of the chair
of pharmaceutical chemistry with a course
of toxicological chemistry of the First MSMU named
after I.M. Sechenov

I.E. Shokhin,
PhD, assistant of the chair of pharmaceutical chemistry
with a course of toxicological chemistry
of the First MSMU named after I.M. Sechenov

T.A. Yarushok,
post-graduate student of the chair
of pharmaceutical chemistry with a course
of toxicological chemistry of the First MSMU
named after I.M. Sechenov

M.A. Sheveleva,
PhD, assistant of the chair of pharmaceutical chemistry
with a course of toxicological chemistry
of the First MSMU named after I.M. Sechenov

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕНОФОВИРА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODS FOR DETERMINATION OF TENOPHOVIR IN THE BLOOD PLASMA OF RABBITS

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Галина Владиславовна Раменская, заведующая кафедрой фармацевтической химии с курсом токсикологической химии
Адрес: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13, здание фармацевтического факультета, 3 этаж, кабинеты 35-45
(фармацевтическая химия, экология) 5 этаж, кабинеты 70-73, 77-88 (токсикологическая химия)
Телефон: 8 (495) 691-13-92
E-mail: pharma@bk.ru

Аннотация. В статье Медведева Ю.В., Раменской Г.В., Шохина И.Е., Ярушок Т.А., Шевелевой М.А. описана разработка и валидация методики определения тенофовира в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 260 нм. Пробоподготовку плазмы крови проводили путем осаждения белков метанолом. Хроматографирование проводили на колонке Waters Atlantis T3 5 мкм, 4,6 x 150 мм, с предколонкой Waters Atlantis T3 5 мкм, 4,6 x 20 мм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил — фосфатный буферный раствор pH 5,70 (16:84), скорость потока 1,0 мл/мин. Калибровочная кривая имела линейную зависимость в диапазоне от 0,23 мкг/мл до 112,98 мкг/мл тенофовира в плазме. Прецизионность методики (RSD, %) составила от 6,08 % до 12,36 %; правильность методики (ε, %) составила от — 2,96 % до 14,55 %. Предел количественного определения составил 0,23 мкг/мл. Методика была применена для сравнительного фармакокинетического исследования препаратов тенофовира на кроликах.

Abstract:Annotation describes development and validation of HPLC method with UV detection at 260 nm for determination of tenofovir in rabbit plasma. Plasma samples were treated by protein precipitation using methanol. HPLC analysis was performed on Waters Atlantis T3 column (5 μ m, 4,6 x 150 mm), with precolumn Waters Atlantis T3 (5 μ m, 4,6 x 20 mm). Acetonitrile –phosphate buffer pH 5.70 (16:84) at 1.0 mL/min was used as mobile phase. The standard curve was linear over the range 0.23 μ g/ml to 112,98 μ g/ml of tenofovir in plasma. Method precision (RSD, %) was 6.08 % to 12.36 % determined on spiked samples. The accuracy of the method (ϵ , %) was – 2.96 % to 14.55 %. The lower limit of quantification was 0.23 μ g/ml. The method was applied to preclinical pharmacokinetics study of tenofovir drug products in rabbits.

Ключевые слова. Тенофовир, плазма, кролики, ВЭЖХ.

Key words. Tenofovir, plasma, rabbits, HPLC, derivatization.

ВВЕДЕНИЕ

Тенофовир — аналог нуклеотида аденозина монофосфата, обладающий специфической ингибирующей активностью по отношению к обратной транскриптазе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2). Тенофовир обладает малой биодоступностью при пероральном употреблении, поэтому применяется в виде производного — тенофовира дизопроксил фумарата [1], обладающего большей биодоступностью. После попадания в кровоток тенофовира дизопроксил фумарат метаболизируется до тенофовира [2]. Структурная формула тенофовира дизопроксила фумарата приведена на Рисунке. 1.

Тенофовир введен в перечень ЖНВЛП 2012 г [3]. С учетом того, что одной из важнейших задач Стратегии развития фармацевтической промышленности до 2020 г. является импортозамещение лекарственных средств [4], в ближайшее время можно ожидать развитие разработки и производства в России воспроизведенных ЛС из вышеупомянутого перечня, в том числе и тенофовира.

Разработан ряд методик определения содержания тенофовира в плазме добровольцев с помощью ВЭЖХ-МС [2, 5], и ВЭЖХ-УФ с применением

твердофазной экстракции [1, 6], а также ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием после дериватизации хлорацетальдегидом [7]. ВЭЖХ-МС методики характеризуются высокой чувствительностью и селективностью, простой пробоподготовкой, включающей в себя только осаждение белков, однако не могут быть осуществлены в лабораториях без масс-спектрометров. ВЭЖХ-УФ методики позволяют получать высококонцентрированные пробы с малым содержанием балластных веществ, но в связи с применением твердофазной экстракции стоимость анализа существенно возрастает. ВЭЖХ методика, приведенная в [7] также трудоемка и предполагает работу с высокотоксичным хлорацетальдегидом. Учитывая большую концентрацию тенофовира в плазме кроликов по сравнению с концентрацией тенофовира в плазме добровольцев, существует возможность разработать методику без применения твердофазной экстракции, дериватизации или масс-спектрометрии, позволяющую оценить концентрацию тенофовира в плазме кроликов.

Целью нашего исследования являлась разработка методики определения тенофовира в плазме кроликов методом ВЭЖХ-УФ.

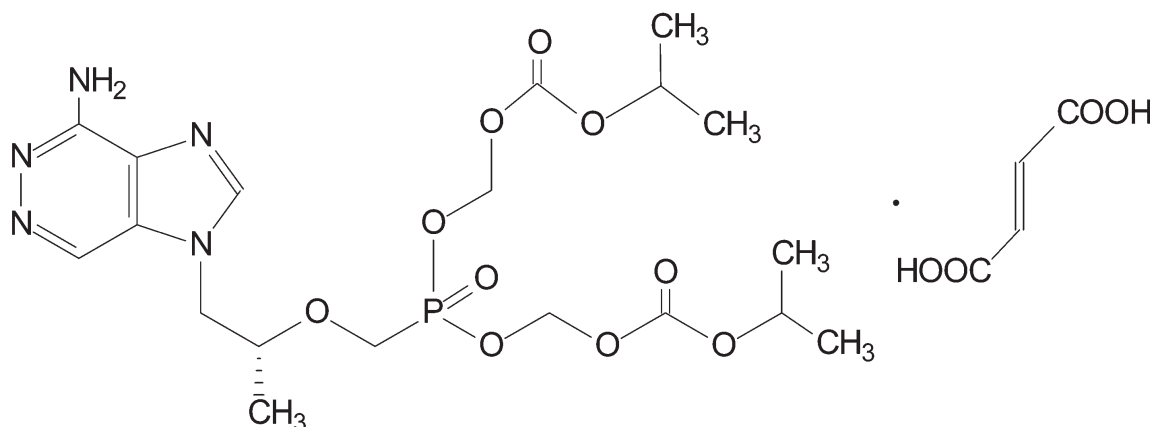


Рис. 1. Структурная формула тенофовира дизопроксила фумарата

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение проводили на жидкостном хроматографе Waters Alliance e2695 (Waters, Сингапур) с диодноматричным детектором Waters 2998, дегазатором, термостатом колонок, термостатом проб, автоматизированным пробоотборником. Разделение проводили на колонке Waters Atlantis T3 5 мкм, 4,6 x 150 мм, с предколоной Waters Atlantis T3 5 мкм, 4,6 x 20 мм при температуре термостата колонок 30°C. Ввод пробы осуществлялся автосамплером. Объем пробы 10 мкл. Скорость потока — 1 мл/мин. Идентификацию тенофовира на хроматограмме осуществляли путем сравнения со стандартом по времени удерживания и УФ-спектру в области от 200 нм до 400 нм.

Для пробоподготовки использовалось следующее оборудование: центрифуга Thermo Scientific, SL16 (США), pH — метр Mettler Toledo, FE20 (Швейцария), весы лабораторные Mettler Toledo, AL 204 (Швейцария), дозаторы переменного объема Ленпипет Дигитал 10 — 100 мкл и 1000 — 1000 мкл (Россия), вортекс-шейкер Heidolph, Reax top (Германия), термошейкер Biosan, TS-100 (Латвия). Для приготовления растворов использовалась вода деионизированная (Milli-Q Advantage A10, Millipore, Франция).

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови кроликов хранили в морозильнике для плазмы Pozis, MM-180/20/35 (Россия) при температуре от — 35 °C до — 40 °C.

Реактивы

Во время исследований использовались следующие вещества: ацетонитрил марки Ultra Gradient Grade, вода деионизированная, хлористоводородная кислота х.ч., натрия гидроксид х.ч., калия дигидрофосфат х.ч., тетрабутиламмония хлорид (Sigma-Aldrich, кат. номер 86870-25G, Lot# BCB03578V).

Приготовление стандартных растворов

Поскольку у основных поставщиков химических реактивов тенофовир отсутствует в базе, его получали путем кислотного гидролиза стандартного раствора тенофовира дизопроксила фумарата. Стандартное вещество — тенофовира дизопроксил фумарат был получен от Zhejiang Tiantai Aurisco Pharmaceutical Co, Ltd (Китай), серия B2-100609.

Для приготовления исходного стандартного раствора 100 мг тенофовира дизопроксил фумарата вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 70 мл 10 % раствора хлористоводородной кислоты и нагревали на водяной бане при температуре 95 °C в течение 1,5 ч при перемешивании. По-

сле охлаждения объем раствора доводили до метки 10 % раствором хлористоводородной кислоты. Концентрация тенофовира в полученном растворе составляла 451,9 мкг/мл. Стандартный раствор тенофовира использовали свежеприготовленным. Для приготовления рабочих растворов тенофовира производили разбавление стандартного раствора тенофовира водой деионизированной. Приготовленные рабочие растворы хранили в холодильнике при 2°C — 8°C в течение 30 дней.

Объекты исследования

Объекты исследования — плазма крови кроликов породы шиншилла.

Пробоподготовка

200 мкл плазмы крови кроликов (чистой, либо плазмы с предварительно прибавленным рабочим стандартным раствором тенофовира) вносили в центрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл, прибавляли 50 мкл метанола, перемешивали на вортекс-шейкере в течение 1 мин встряхивали на шейкере при 1000 об/мин в течение 10 мин, и центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 минут. 160 мкл надосадочной жидкости переносили в хроматографические флаконы для микрообъемов.

Приготовленные пробы анализировали в течение суток.

Валидация методики определения тенофовира в плазме кроликов

Методика определения тенофовира в плазме кроликов была валидирована по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел количественного определения, прецизионность, правильность.

Результаты и их обсуждение

Условия хроматографического разделения

Учитывая химические и физико-химические свойства тенофовира были подобраны следующие условия для хроматографического разделения тенофовира: изократическое элюирование смесью ацетонитрил — фосфатный буферный раствор pH 5,70 (состава 5,44 г калия дигидрофосфата и 2,22 г тетрабутиламмония хлорида в 2000 мл воды) в соотношении 16 : 84. Время удерживания тенофовира в данных условиях составляло около 16 минут, общее время анализа — 20 минут. Детектирование тенофовира проводили на УФ детекторе при длине волны 260 нм.

Параметры пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки по пику тенофовира: от 2100 до 2000 т.т., фактор асимметрии: около 1,25.

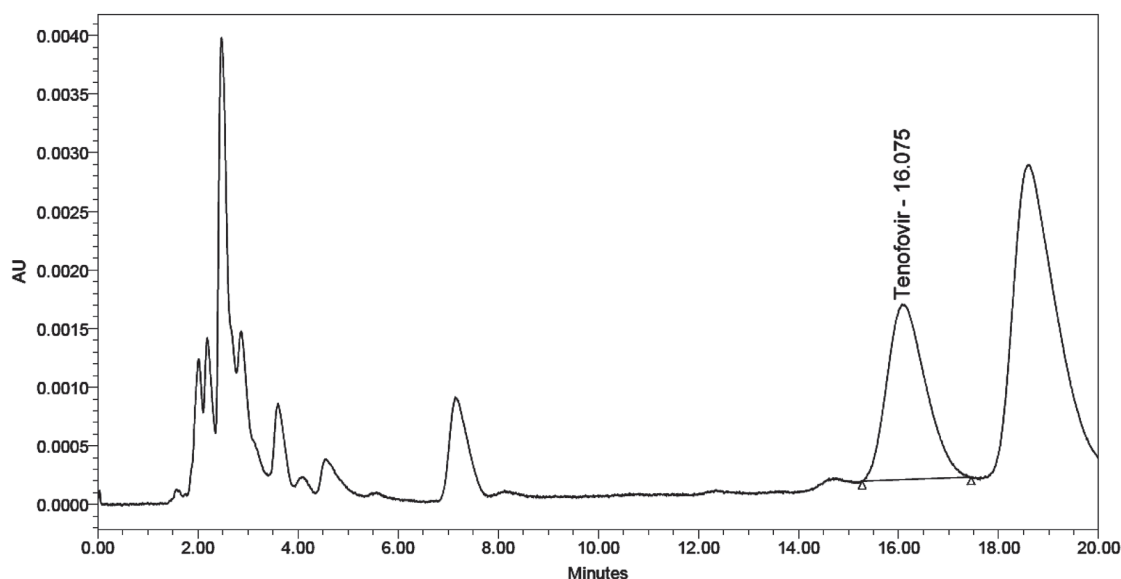


Рис. 2. Хроматограмма разделения тенофовира в плазме кролика

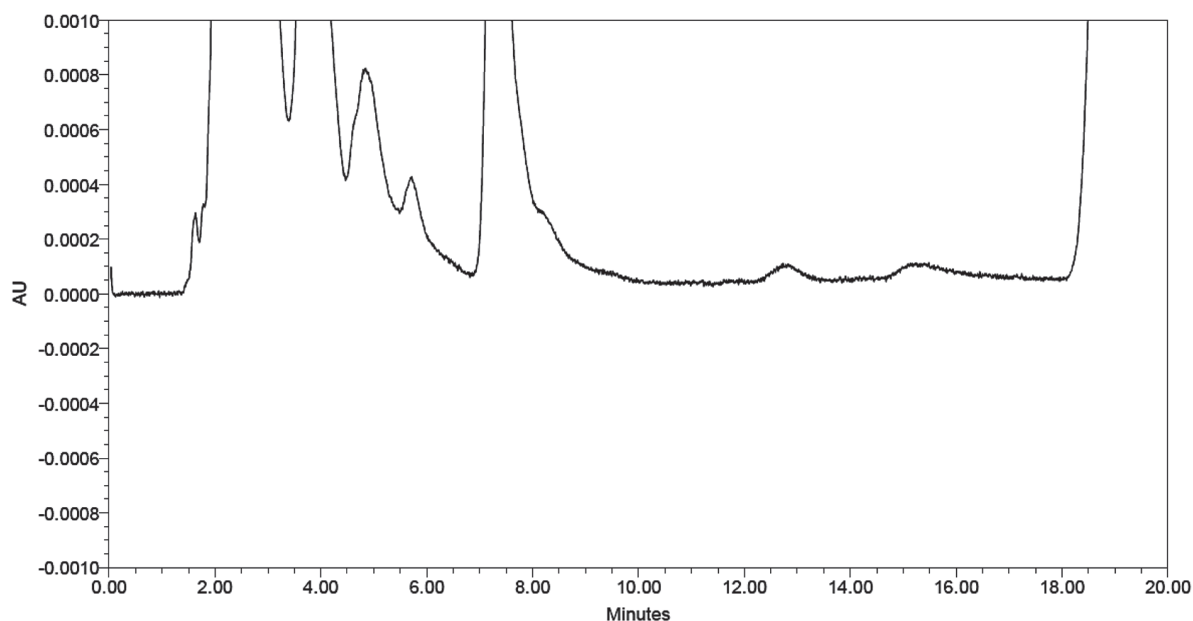


Рис. 3. Хроматограмма чистой плазмы кролика

В качестве примера разделения тенофовира в предложенных условиях на Рисунке 2 приведена хроматограмма плазмы кролика с прибавлением рабочего стандартного раствора тенофовира до концентрации 9,04 мкг/мл.

Определение специфичности

Для определения специфичности методики проводили анализ 6 образцов чистой плазмы, а также образцов чистой плазмы с прибавлением рабочего стандартного раствора.

На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, со-

ответствующем времени удерживания тенофовира. На Рисунке 3 приведена хроматограмма чистой плазмы кролика.

Определение линейности

Для определения линейности проводили анализ 6 проб чистой плазмы с прибавлением рабочего стандартного тенофовира до получения концентраций: 0,23 мкг/мл, 2,26 мкг/мл, 9,04 мкг/мл, 45,19 мкг/мл, 90,38 мкг/мл, 112,98 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 3 раза. По полученным значениям был построен калибровочный график

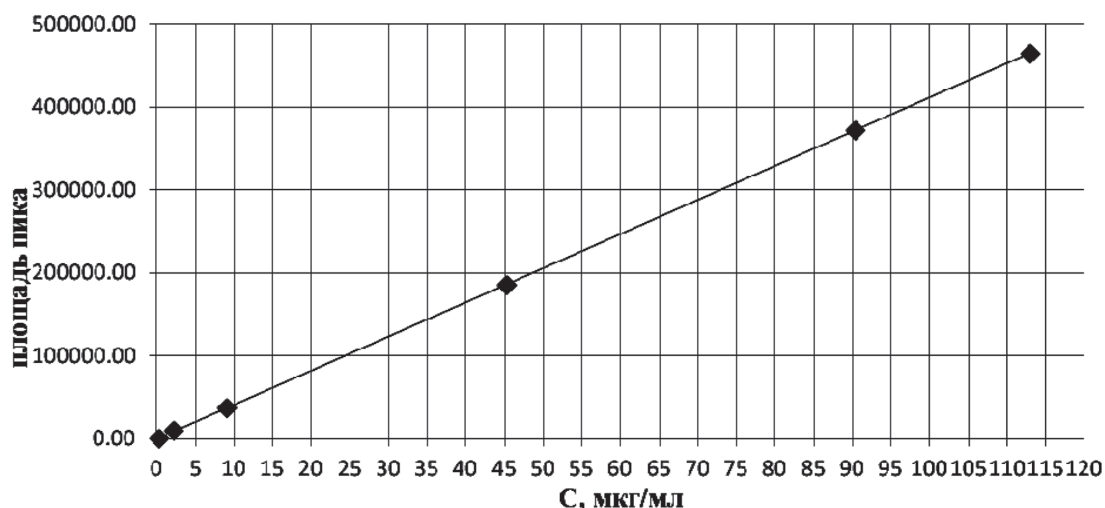


Рис. 4. Калибровочный график зависимости площади пика тенофовира от его концентрации в плазме крови

(коэффициент корреляции более 0,999), приведенный на Рисунке 4.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений, приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

С факт, мкг/мл	0,23	2,26	9,04
С рассчит, мкг/мл	0,25	2,37	8,77
ε, %	8,7	4,9	-2,7
норма	не более 20 %	не более 15 %	

Полученные отклонения соответствуют нормам установленным в руководстве ЕМА по валидации биоаналитических методик (Guideline on validation of bioanalytical methods, 2009) [8].

Определение прецизионности и правильности методики

Для определения прецизионности и правильности проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением рабочего стандартного раствора тенофовира до получения концентраций: 0,23 мкг/мл, 2,26 мкг/мл, 9,04 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %), приведенные в Таблице 2.

Таблица 2

Правильность и прецизионность методики

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
0,23	0,26	0,25	12,36	14,55
	0,28			
	0,20			
	0,27			
	0,25			
2,26	2,34	2,37	6,08	4,96
	2,51			
	2,15			
	2,37			
	2,49			
9,04	8,13	8,77	7,74	-2,96
	8,01			
	9,22			
	0,26			
	0,28			

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %) соответствуют нормам установленным в руководстве ЕМА. [6] (не более 20 % минимальной концентрации, не более 15 % — для остальных двух концентраций).

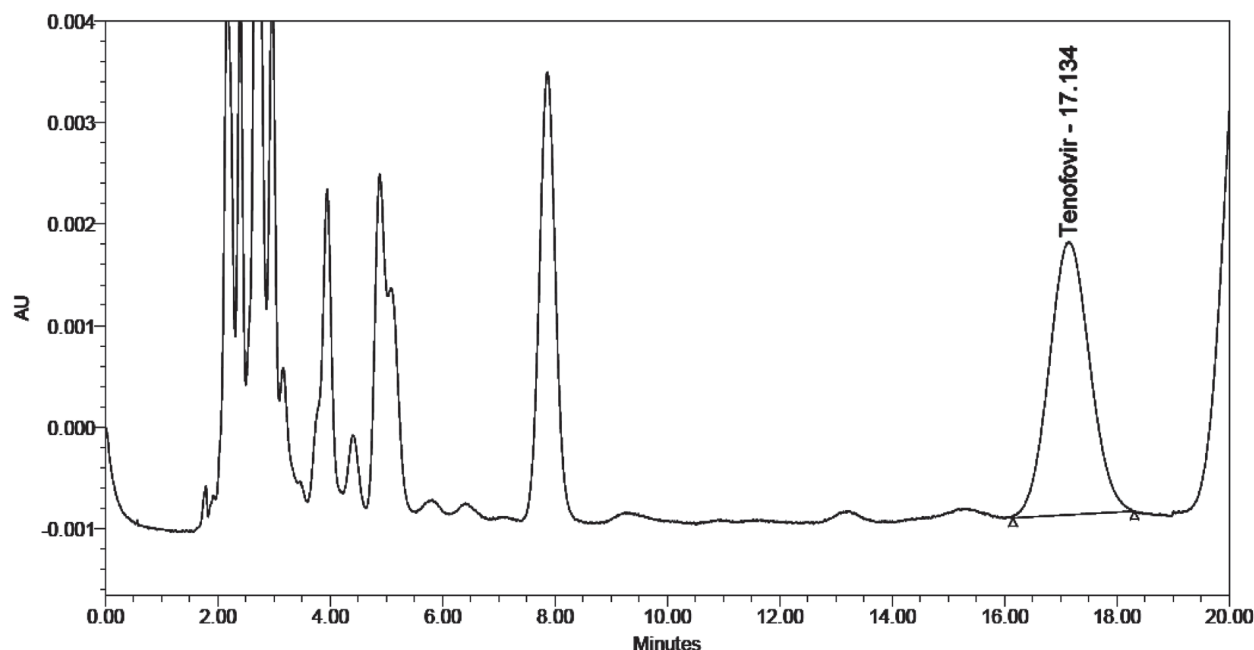


Рис. 5. Хроматограмма исследуемой плазмы кроликов (концентрация тенофовира 32,91 мкг/мл) спустя 1 ч после внутривенного приема препарата тенофовира (таб. 300 мг)

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация тенофовира в плазме, для которой возможно определение тенофовира со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения тенофовира с помощью разработанной методики составил 0,23 мкг/мл.

Применение к фармакокинетическим исследованиям

Разработанная методика была успешно применена для сравнительного фармакокинетического исследования препаратов тенофовира на кроликах. 6 кроликам породы шиншилла вводили внутривенно, натошак исследуемый препарат тенофовира и препарат сравнения. Отбор проб крови осуществляли из краевой ушной вены. До применения препарата отбиралась исходная проба крови (0 образец). Далее отбор крови производился через 0,5 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч после приема препарата. Кровь в количестве 1,5 мл отбирали в гепаринизированные центрифужные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, отделяли плазмы и хранили при температуре -35°C до проведения анализа. Промежуток времени между отбором крови и ее обработкой не превы-

шал 5 мин. Пробы с сопроводительными документами с указанием кодировки проб предоставляли в фармакокинетическую лабораторию¹. Типичная хроматограмма плазмы крови кроликов после внутривенного приема исследуемого препарата тенофовира приведена на Рисунке 5.

ВЫВОДЫ

Разработана методика определения тенофовира в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Разработанная методика подвергнута процедуре валидации по характеристикам: специфичность, линейность, предел количественного определения, прецизионность, правильность.

С помощью разработанной методики было проведено определение содержания тенофовира в плазме крови кроликов в доклинических фармакокинетических исследованиях.

Список литературы

1. S. Sentenac, C. Fernandez, A. Thuillier, P. Lechat, G. Aymard. Journal of Chromatography B, 793, 317–324 (2003).

¹ более детальная информация об исследовании не может быть приведена в связи с конфиденциальностью данных

2. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств (ЖНВЛП). Утвержден Распоряжением Правительства РФ N 2199-р от 7 декабря 2011 г.
3. Приказ «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 г». Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. — М., 2009 г. http://www.minpromtorg.gov.ru/ministry/strategic/sectoral/7/utverzhdennaya_strategiya_farma2020_231009.pdf (проверено 02.03.2012).
4. T. Delahunty, L. Bushman, C.V. Fletcher. *Journal of Chromatography B*, 830, 6–12 (2006).
5. N.A. Gomes, V.V. Vaidya, A. Pudage, S.S. Joshi, S.A. Parekh. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 918–926, (2008).
6. N. Rezk, R. Crutchley, A. Kashuba. *Journal of Chromatography B*, 822, 201–208, (2005).
7. J. A. H. Droste, C. P. Verweij-van Wissen, B. P. Kearney, R. Buffels, P. J. van Horssen, Y. A. Hekster, D. M. Burger. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 680–684, (2005).
8. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.