

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОПИРАМАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ С ПРЕДКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ

THE DETERMINATION OF TOPIRAMATE IN PLASMA RABBIT BLOOD BY HPLC WITH SPECIFIC DERIVATIZATION

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. Разработка и валидация методики определения топирамата в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией.

Annotation. The paper of Shohin I.E., Ramenskaya G.V., Medvedev Yu.V., Yarushok T.A., Sheveleva M.A.¹ is devoted to development and validation of HPLC method determination of topiramate in rabbit plasma with pre-column derivatization. Topiramate was extracted from plasma by dichloromethane. Derivatization was performed by dansyl chloride in borate buffer. HPLC analysis was performed on C18 column (3 μ m, 4,6 x 75 mm). Acetonitrile – 25 mM phosphate buffer pH 2.50 (30:70) at 1.0 mL/min was used as mobile phase. The standard curve was linear over the range 0.95 μ g/ml to 47.32 μ g/ml of topiramate in plasma. Within-run precision was 1.55 % to 2.12 % and between-run precision was 1.67 % to 8.09 % determined on spiked samples. The accuracy of the method was 1.14 % to 19.62 % (within-run) and 1.74 % to 19.25 (between-run). The lower limit of quantification was 0.95 μ g/ml. The method was applied to preclinical pharmacokinetics study of topiramate drug products in rabbits.

Ключевые слова. Топирамат, плазма, кролики, ВЭЖХ, дериватизация.

Keywords. Topiramate, plasma, rabbits, HPLC, derivatization.

ВВЕДЕНИЕ

Топирамат является противоэпилептическим препаратом, относящимся к классу сульфамат-замещенных моносахаридов (рис. 1).

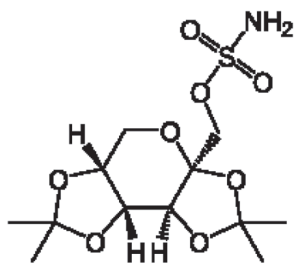


Рис. 1. Структурная формула топирамата

Топирамат всасывается быстро и эффективно после внутреннего применения, его биодоступность составляет 81%. Период полувыведения топирамата из плазмы в среднем составляет 21 ч [1].

Топирамат введен в перечень ЖНВЛП 2012 г. [2]. С учетом того, что одной из важнейших задач Стратегии развития фармацевтической промышленности до 2020 г. является импортозамещение лекарственных средств [3], в ближайшее время можно ожидать развитие разработки и производства в России воспроизведенных ЛС из перечня ЖНВЛП 2012 г, в том числе и топирамата.

Для государственной регистрации в Российской Федерации воспроизведенное лекарственное средство должно пройти сравнительного исследования либо терапевтической эквивалентности, либо биоэквивалентности [4]. Чтобы снизить риски субъектов клинического исследования, связанных с биологической неэквивалентностью ЛС, рекомендуется предварительно проводить доклинические сравнительные исследования фармакокинетики на лабораторных животных. Наиболее часто для данной цели используют кроликов.

Для определения концентрации лекарственных средств и (или) их метаболитов в плазме необходимо использование высокочувствительных аналитических методов.

Определение топирамата в плазме осложнено тем, что этот препарат не обладает способностью поглощать свет в УФ или видимом диапазоне, а также не флюоресцирует [5]. В литературе опубликованы методики определения топирамата в плазме человека методами газовой хроматографии (ГХ) с пламенно-ионизационным и азотно-фосфорным детектором [6], высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-селективным [7] и tandemным масс-спектрометрическим (МС-МС) детектором [8]. Чувствительность ГХ-методик составляет от 500 до 1 мкг/мл [6] в плазме и может быть недостаточной, а tandemные масс-спектрометры являются крайне дорогостоящим оборудованием.

Оптимальным решением для определения топирамата может стать ВЭЖХ с предварительной дериватизацией и флюориметрическим детектированием. Опубликованы методики определения топирамата методом ВЭЖХ с УФ или флюориметрическим детектированием после дериватизации по аминогруппе с FMOC-Cl в плазме крови человека [9–10]. В то же время, чтобы применить данные методики для анализа топирамата в плазме крови кроликов, требуется последующая ревалидация.

Таким образом, разработка и валидация методики определения топирамата в плазме крови кроликов является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракцию топирамата из плазмы проводили дихлорметаном, дериватизацию путем реакции с дансилхлоридом в боратном буфере. Хроматографирование проводили на колонке C18 3 мкм, 4,6 x 75 мм. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил – 25 mM фосфатный буферный раствор pH 2,50 (30 : 70), скорость потока 1,0 мл/мин.

Калибровочная кривая имела линейную зависимость в диапазоне от 0,95 до 47,32 мкг/мл топирамата в плазме. Прецизионность методики составила от 1,55 до 2,12% на уровне within-run и от 1,67 до 8,09% на уровне between-run. Правильность методики составила от 1,14 до 19,62% на уровне within-run и от 1,74

до 19,25% на уровне between-run. Предел количественного определения — 0,95 мкг/мл. Методика была применена для сравнительного фармакокинетического исследования препаратов топирамата на кроликах.

Растворы и реактивы

Топирамат (гленмарк дженерикс лимитед, Индия, содержание топирамата 98,86%), дансилхлорид (Sigma-Aldrich, кат. номер D2625-1G, Lot# BCBF 3360V), ацетонитрил (для ВЭЖХ, Panreac, Испания), муравьиная кислота (ч.д.а., Panreac, Испания), натрия тетраборат (х.ч., Panreac, Испания), натрия гидроксид (ч.д.а., Panreac, Испания), гексан (х.ч., Химмед, Россия), калия дигидрофосфат (х.ч., Panreac, Испания), фосфорная кислота (ч.д.а., Panreac, Испания). Для приготовления растворов использовалась вода бидистиллированная (Milli-Q Advantage A10, Millipore, Франция).

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови кроликов хранили в морозильнике для плазмы Pozis, MM-180/20/35 при температуре от 35 до – 40 °С.

Для приготовления исходного стандартного раствора топирамата, 23,9 мг субстанции топирамата вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде и доводили объем раствора водой до метки. Полученный раствор имел концентрацию топирамата 236,3 мкг/мл. Стандартные растворы топирамата готовили путем разведения исходного стандартного раствора топирамата водой.

Пробоподготовка

200 мкл чистой плазмы крови кроликов (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором топирамата) вносили в микроцентрифужные пробирки Eppendorf с фиксатором закрытия вместимостью 2 мл, прибавляли 1 мл дихлорметана с помощью флакон-диспенсера (Eppendorf, Varispenser 0,5 – 2,5 мл, Германия), встряхивали на шейкере (Biosan, TS-100, Латвия) при 1400 об/

мин в течение 10 мин, центрифугировали на центрифуге (Thermo Scientific, SL16, США) при 15200 об/мин в течение 10 мин и отделяли нижний (органический) слой. Органический слой упаривали на испарителе под током азота (Thermo, Reacti-Therm, США) при 38 °С до получения сухого остатка. К полученному сухому остатку прибавляли 200 мкл 1% раствора дансилхлорида в ацетонитриле и 250 мкл боратного буфера pH 9,5. Дериватизацию проводили при 45 °С в течение 30 мин, затем снова упаривали на испарителе под током азота при 45 °С до получения сухого остатка. Полученный сухой остаток

Условия хроматографирования

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Waters Alliance e2695, Сингапур) с флуориметрическим детектором 2475 ($\lambda_{ex} = 300$ нм, $\lambda_{em} = 495$ нм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил – 25 мМ фосфатный буферный раствор pH 2,50 30:70 (10,2 г калия дигидрофосфата растворяли в 3000 мл воды, доводили pH до 2,50 фосфорной кислотой). Фазу предварительно профильтровали и дегазировали. Скорость потока подвижной фазы: 1 мл/мин. Разделение происходило с использованием хроматографической колонки Waters Symmetry C18 3 мкм, 4,6 x 75 мм, предколонка Waters Atlantis T3 5 мкм, 4,6 x 20 мм при температуре 20 °С.

Объем вводимой пробы: 5 мкл. Время хроматографирования: 18 мин. Время удерживания топирамата составило около 11 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию методики проводили согласно руководствам по валидации биоаналитических методик FDA (Guidance for Industry: Bioanalytical method

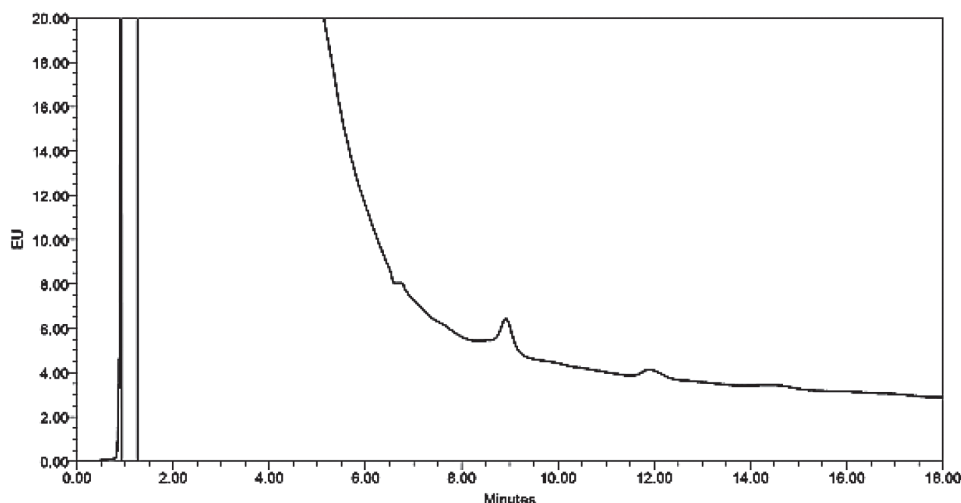


Рис. 2. Хроматограмма чистой плазмы кроликов

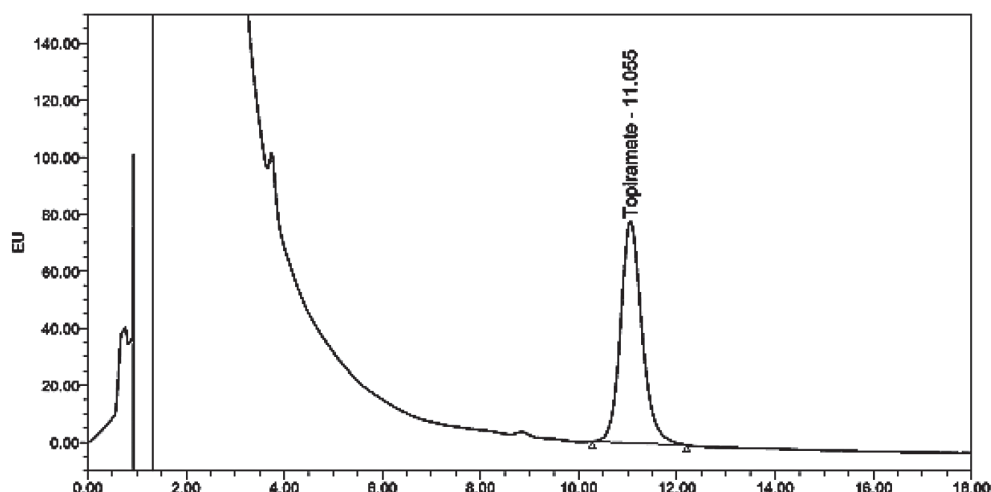


Рис. 3. Хроматограмма чистой плазмы кроликов с добавлением стандартного раствора топирамата до получения концентрации 9,45 мкг/мл

validation, 2001) [11] и EMA (Guideline on validation of bioanalytical methods, 2009) [12] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне within-run и between-run), предел количественного определения.

Специфичность

Производили анализ 6 образцов чистой плазмы, образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора топирамата до получения концентрации 9,45 мкг/мл по вышеописанной методике. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующем времени удерживания топирамата (хроматограммы чистой плазмы, чистой плазмы с

прибавлением стандартного раствора топирамата до получения концентрации 9,45 мкг/мл приведены на рис. 2–3).

Параметры пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки по пику топирамата: 3333 теоретических тарелок, фактор асимметрии – 1,19.

Линейность

Производили анализ 6 образцов чистой плазмы с добавлением стандартного раствора топирамата до получения концентраций: 0,95 мкг/мл, 4,73, 9,45, 23,63 и 47,32 мкг/мл. По полученным значениям построен калибровочный график ($r^2 > 0,999$), (рис. 4) совместно с уравнением линейной зависимости.

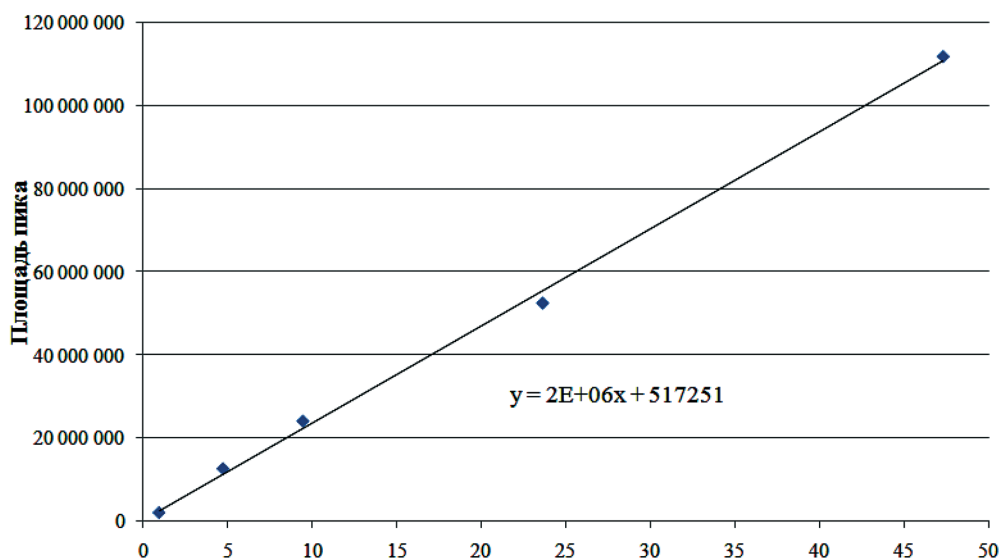


Рис. 4. Калибровочный график зависимости площади пика топирамата от его концентрации в плазме крови кроликов

Прецизионность и правильность

Прецизионность и правильность методики определяли на двух уровнях — в течение 1 хроматографической последовательности (within-run precision и within-run accuracy) и в течение нескольких хроматографических последовательностей (between-run precision и between-run accuracy).

Производили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора топирамата до получения концентраций: 0,95 мкг/мл, 9,45 и 47,32 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) (табл. 1–2).

Таблица 1

Прецизионность и правильность методики определения топирамата в плазме крови кроликов на уровне одной хроматографической последовательности

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл, среднее значение (n = 5)	RSD, % (n = 5)	ϵ , %
0,95	1,12	1,13	1,83	19,62
	1,15			
	1,15			
	1,11			
	1,13			
9,45	9,29	9,51	1,55	0,62
	9,52			
	9,50			
	9,55			
	9,70			
47,32	45,97	46,78	2,12	-1,14
	46,37			
	46,41			
	46,66			
	48,50			

Таблица 2

Прецизионность и правильность методики определения топирамата в плазме крови кроликов на уровне двух хроматографических последовательностей

Введено, мкг/мл	Найдено (мкг/мл)	Найдено, мкг/мл, среднее значение (n = 10)	RSD, % (n = 10)	ϵ , %
0,95	1,08	1,13	8,09	19,25
	1,17			
	1,29			
	1,15			
	0,92			
9,45	9,66	9,62	1,67	1,74
	9,68			
	9,67			
	9,88			
	9,72			
47,32	43,06	44,94	4,58	-5,02
	43,02			
	42,83			
	43,00			
	43,62			

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) соответствуют нормам документов FDA и EMA (не более 20 % минимальной концентрации, не более 15 % для остальных двух концентраций) [11,12].

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация топирамата в плазме, для которой возможно определение топирамата со значениями

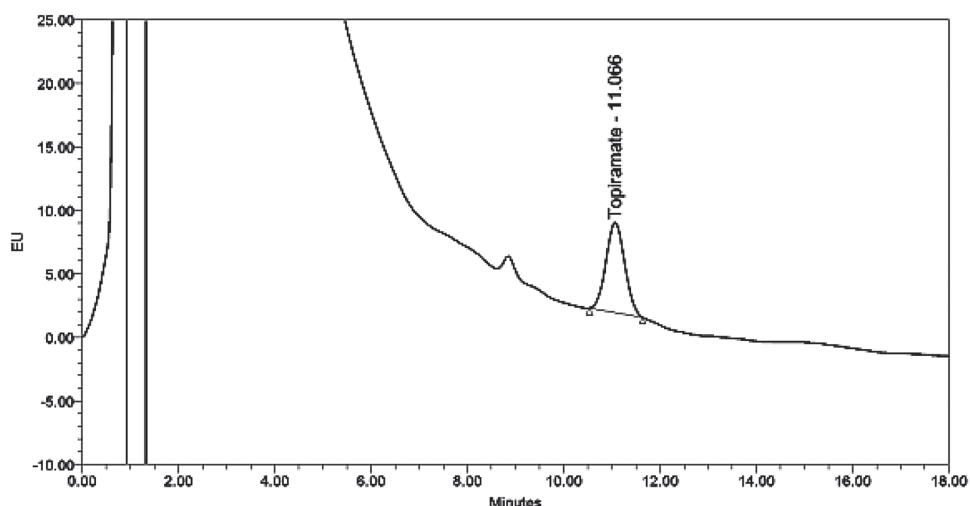


Рис. 5. Хроматограмма чистой плазмы с добавлением стандартного раствора топирамата на уровне ПКО (0,95 мкг/мл)

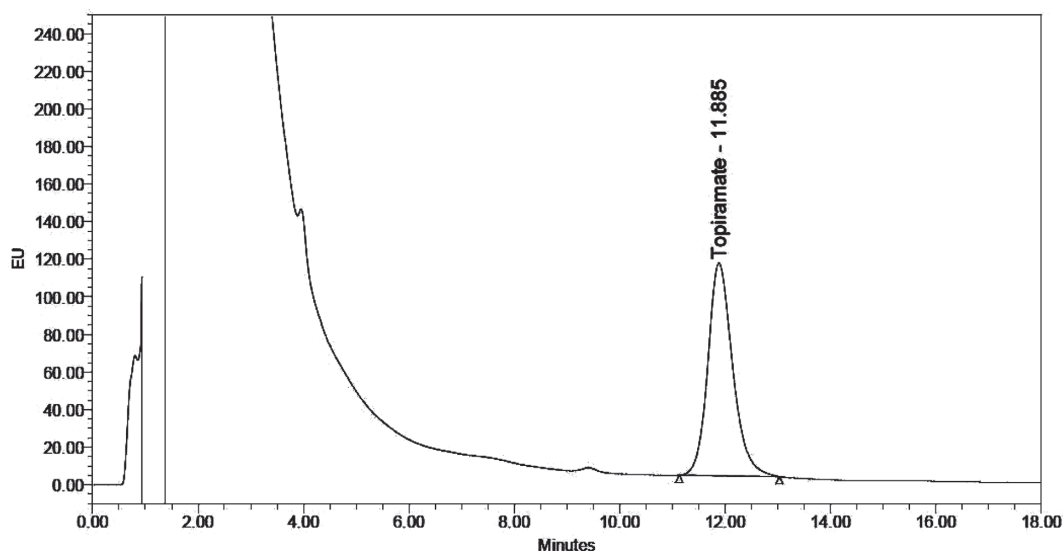


Рис. 6. Хроматограмма исследуемой плазмы кроликов (концентрация топирамата 14,02 мкг/мл) спустя 4 ч после внутрижелудочного приема препарата топирамата (таб. п.п.о. 100 мг)

RSD и ϵ не более 20% в диапазоне линейной зависимости.

Предел количественного определения методики составил 0,95 мкг/мл (хроматограмма, демонстрирующая предел количественного определения методики обозначена на рис. 5).

Применение к фармакокинетическим исследованиям

Разработанная методика была успешно применена для сравнительного фармакокинетического исследования препаратов топирамата на кроликах. Шести кроликам породы шиншилла вводили внутрижелудочно, натошак исследуемый препарат топирамата 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, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 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 превышал 5 мин.

Пробы с сопроводительными документами с указанием кодировки проб предоставляли в фармакокинетическую лабораторию¹.

Типичная хроматограмма плазмы крови кроликов после внутрижелудочного приема исследуемого препарата топирамата приведена на рис. 6.

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

ВЫВОДЫ

Таким образом, разработанная нами методика определения топирамата в плазме крови кроликов оказалась чувствительной, точной и воспроизводимой. Данная методика может применяться для количественного определения топирамата в плазме крови кроликов на стадии доклинических исследований новых воспроизведенных лекарственных средств топирамата.

Список литературы

1. База данных <http://www.drugs.com/pro/topiramate.html>. Официальная информация FDA (проверено 02.03.2012).
2. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств (ЖНВЛП): Утв. Распоряжением Правительства РФ [от 07.12. 2011 № 2199-р].
3. Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 г: Приказ / Мин-во промышленности и торговли Российской Федерации. М., 2009. http://www.minpromtorg.gov.ru/ministry/strategic/sectoral/7/utverzhdennaya_strategiya_farma2020_231009.pdf (проверено 02.03.2012).
4. Об обращении лекарственных средств: Фед. закон Российской Федерации [от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ].
5. Bahrami G, Mirzaeei S, Mohammadi B, Kiani A. High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005; 822(1-2): 322-5.
6. Riffitts JM, Gisclon LG, Stubbs RJ, Palmer ME. A capillary gas chromatographic assay with nitrogen phosphorus detection for the quantification of topiramate in human plasma, urine and whole blood. J Pharm Biomed Anal. 1999; 19(3-4): 363-71.

7. Chen S, Carvey PM. Rapid approach to the quantitative determination of topiramate (2, 3:4,5-bis-O-(1-methylethylidene)-beta-D-fructopyranose sulfamate) in human plasma by liquid-liquid extraction and flow-injection negative-ion electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999; 13(20): 1980-4.
8. Park JH, Park YS, Lee MH, Rhim SY, Song JC, Lee SJ, Kim JM, Shaw LM, Kang JS. Determination of plasma topiramate concentration using LC-MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence studies in healthy Korean volunteers. *Biomed Chromatogr*. 2008; 22(8): 822-9.
9. Bahrami G, Mirzaeei Sh, Kiani A. Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 25; 813(1-2): 175-80.
10. Bahrami G, Mirzaeei S, Mohammadi B, Kiani A. High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 822(1-2): 322-5.
11. 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.
12. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.