

ОПЫТ ВАЛИДАЦИИ ВЭЖХ-МЕТОДИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СИФИЛИСА

Киселева Н.В.¹, Левчик Н.К.¹

¹ГБУ СО «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии», Екатеринбург, e-mail: nklevchik@gmail.com

Лечение сифилиса по-прежнему представляет серьезную проблему в связи со значительным числом неудач терапии и развития состояния серорезистентности. Терапевтический лекарственный мониторинг является основой рациональной антибиотикотерапии. Он применяется для оптимизации индивидуального режима дозирования препарата. Фармакокинетические исследования (важнейшая составная часть терапевтического лекарственного мониторинга) основаны на измерении концентрации лекарственного препарата в биологических жидкостях. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является наиболее распространенным методом в области фармакокинетических исследований благодаря высокой чувствительности и селективности разделения. Внедрение ВЭЖХ-методик в рутинные лабораторные технологии ограничено трудностями их валидации. В статье представлена схема валидации ВЭЖХ-методик определения антибактериальных препаратов пенициллинового и цефалоспоринового ряда в плазме крови и цереброспинальной жидкости, применяющихся в настоящее время для лечения больных сифилисом. Рассмотрены основные критерии валидации ВЭЖХ-методик применительно к работе с биологическим материалом: выбор экстракционной технологии, проверка специфичности, построение калибровочного графика и проверка линейности, измерение величины предела количественного определения, проверка точности и прецизионности. Особое внимание уделено проблемам определения низких концентраций и решению аналитических проблем определения β -лактамов, связанных с низкой экстракцией полярных пенициллинов и цефалоспоринов из биологического материала и относительно низкими коэффициентами молярного поглощения в УФ-диапазоне.

Ключевые слова: валидация, ВЭЖХ, терапевтический лекарственный мониторинг, фармакокинетические исследования, антибиотики, плазма крови, ЦСЖ, сифилис.

EXPERIENCE OF VALIDATION OF HPLC-METHODS FOR DETERMINING THE CONCENTRATION OF ANTIBACTERIAL DRUGS FOR THE TREATMENT OF SYPHILIS IN BIOLOGICAL FLUIDS

Kiseleva N.V.¹, Levchik N.K.¹

¹Ural Scientific Research Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Ekaterinburg, e-mail: nklevchik@gmail.com

Treatment of syphilis is still a serious problem due to the significant number of treatment failures and the development of a serofast reaction. Therapeutic drug monitoring is the basis of rational antibiotic therapy. It is used to optimize the individual dosing mode of the drug. Pharmacokinetic studies (the most important part of therapeutic drug monitoring) are based on measuring the concentration of a drug in biological fluids. High performance liquid chromatography (HPLC) is the most common method in pharmacokinetic studies due to its high sensitivity and separation selectivity. The implementation of HPLC techniques to routine laboratory technologies is limited by the difficulties of their validation. The article presents the scheme of validation of HPLC techniques for the determination of the antibacterial drugs of the penicillin and cephalosporin series in blood plasma and cerebrospinal fluid, which are currently used to treat patients with syphilis. The main criteria for the validation of HPLC techniques are considered in relation to working with biological material: selection of extraction technology, verification of specificity, construction of a calibration graph and verification of linearity, measurement of the magnitude of the limit of quantitation, verification of accuracy and precision. Particular attention is paid to the problems of determining low concentrations solving analytical problems of determining β -lactams associated with low extraction of polar penicillins and cephalosporins from biological material and relatively low molar absorption coefficients in the UV range

Keywords: validation, HPLC, therapeutic drug monitoring, pharmacokinetic studies, antibiotics, blood plasma, CSF, syphilis.

Лечение сифилитической инфекции по-прежнему представляет проблему в связи со значительным числом неудач терапии и развития состояния серорезистентности. Фармакокинетический мониторинг мог бы помочь в решении данной проблемы. Первоначальным этапом внедрения в клиническую практику является сложный и трудоемкий процесс валидации ВЭЖХ-методики применительно к конкретной аналитической задаче. Валидация ВЭЖХ-методик, направленная на оценку качества лекарственного препарата, регламентирована специальными разделами в фармакопеях Российской Федерации (XIII изд.), Европейского союза и США, протоколы валидации подробно представлены в рекомендациях Международной Вашингтонской конференции по гармонизации (ICH) 1994 года и в специальном руководстве FDA. Универсальных протоколов валидации методик фармакокинетических исследований в настоящее время не существует. Такой протокол должен составляться каждый раз в зависимости от поставленной задачи, а основные валидационные характеристики должны критически рассматриваться применительно к используемой биологической матрице. Для внедрения фармакокинетического мониторинга терапии сифилиса необходимо решение двух основных аналитических задач. Первая – определение в крови и цереброспинальной жидкости низких концентраций препарата. Область линейности при определении бензилпенициллина натриевой соли (БПНС) методом ВЭЖХ, установленная в нескольких аналитических методиках, составляет 1–20 мкг/мл [1]. За минимальную трепонемоцидную концентрацию (МТК) принят уровень БПНС, равный 0,018 мкг/мл [2]. Таким образом, МТК находится в диапазоне низких концентраций, что затрудняет оценку терапевтической эффективности антибиотикотерапии. Вторая – решение проблем определения β -лактамов, связанных с низкой экстракцией полярных веществ из биологического материала и относительно низкими коэффициентами молярного поглощения в УФ-диапазоне (215–230 нм) [3].

Целью настоящей работы являлась разработка и апробация методологии процесса валидации при внедрении ВЭЖХ-методики определения пенициллинов и цефалоспоринов в плазме крови и цереброспинальной жидкости в процессе терапии сифилиса.

Материалы и методы исследования. Научно-информационный поиск в российских и зарубежных электронных базах данных, анализ литературы и проверка на практике всех этапов процесса валидации. Использовалась система Smartline (Knauer), состоящая из насоса Pump 1050, термостата колонки ColumnOver 4050, диодно-матричного детектора PDA Detector 2800, который позволяет снимать весь спектр в процессе анализа на разных длинах волн, инжектора (V7452). Программное обеспечение – ClarityChromV.2.6.

Результаты исследования и их обсуждение

Подготовка ВЭЖХ-системы и выбор методики. На этапе подготовки ВЭЖХ-системы

необходимо протестировать колонку, используя элюенты различной концентрации. Главные показатели качества колонки – чувствительность (амплитуда пика) и разрешающая способность колонки [4]. Мы использовали колонку Kromasil 100-5C18 (150×4,6 мм, 5 мкм). Рассчитанные параметры были удовлетворительными (отклонение не более 10–20% от заявленных производителем). При использовании колонок с высокой чувствительностью и разрешающей способностью для рутинных методик нет необходимости определять наименьшую концентрацию анализируемого вещества в образце (LOD), основным параметром, согласно требованиям Фармакопеи США, считается предел количественного определения (LOQ). При выборе методологии решался вопрос достаточной чувствительности УФ-детекции для определения минорных концентраций пенициллинов и цефалоспоринов, имеющих низкие коэффициенты молярного поглощения в УФ-области спектра. Как альтернативу рассматривали применение масс-спектрометрического детектора. Но при исследовании полярных соединений, какими являются большинство β-лактамовых антибиотиков, достаточно сложно нивелировать влияние компонентов биологической матрицы на процессы ионизации, так называемый матричный эффект. Использование ВЭЖХ с участием гидрофильных взаимодействий способствует устранению «матричного эффекта» в большей степени, чем методология обращенно-фазового режима в ВЭЖХ/МС [5]. Однако в нормально-фазовой ВЭЖХ компоненты элюентов быстро испаряются, изменяя элюирующую силу буфера, следствием чего является плохая воспроизводимость. Так как воспроизводимость результатов ВЭЖХ в биологических жидкостях является одним из самых важных показателей для фармакокинетических исследований, наш выбор остался за методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием, в которой используют полярные растворители в качестве элюентов и модифицированные силикагели C₁₈ для заполнения колонок. Такая система обеспечивает предсказуемость поведения любых разделяемых веществ в хроматографической системе и отличную воспроизводимость и очень широко используется при анализе лекарственных препаратов [4].

Хроматографирование проводили в изократическом режиме. При валидации ВЭЖХ-методики для определения БПНС за основу была принята аналитическая методика определения пиперациллина в плазме крови [6]. Подвижная фаза: ацетонитрил 0,1 М - водный раствор дигидрофосфата калия - изопропанол, (12:84:4 по объему), предварительно профильтрованная и дегазированная, рН 6,2. Скорость потока подвижной фазы: 0,85 мл/мин., температура 30 °С, время хроматографирования 30 мин., длина волны 215 нм, время удерживания ~8 мин. При выборе ВЭЖХ-методики для определения цефтриаксона (ЦТ) мы отдали предпочтение ион-парной хроматографии, для которой можно было использовать ту же самую колонку C₁₈, заполненную октадецилсиликагелем [7]. В качестве противоионов мы

использовали тетрабутиламмония бромид. Буфер рН 7,6, детектирование при 274 нм, время удерживания ~6 мин.

Пробоподготовка. Выбор экстракционной технологии должен соответствовать задаче исследования и пройти экспериментальную проверку на имеющейся аналитической системе. Так как мы исследуем диапазон низких значений аналита, технология пробоподготовки должна включать концентрирование экстракта биопробы. Проблема концентрирования β -лактамов достаточно серьезна из-за их термолабильности. Упаривание экстрактов после преципитации или твердофазной экстракции требует особых температурных условий (не выше 40 °С). Разработан универсальный протокол для экстракции β -лактамов пенициллинового ряда из крови с использованием SPE технологии на Puroprep-200B [8], но твердофазная экстракция не всегда доступна при малом количестве биологического материала, как в случае работы с ЦСЖ.

Технология ультрафильтрации с применением мембранных фильтров типа Amicon (Millipore) была признана единственной пригодной технологией очистки от примесей в стандартном методе LC-MS, одобренном FDA, для определения содержания рифампицина и тиоридазина в биологических жидкостях [9]. Однако, в отличие от разделения лекарственных субстанций в простых водных растворах, центрифужные фильтры значительно менее пригодны для биологических образцов, так как: а) в биологических матрицах могут присутствовать ингибиторы, прочно связывающие лекарственный препарат и мешающие его фильтрации, б) полученный центрифугат не всегда совместим с подвижной фазой при хроматографировании, в) низкомолекулярные белки могут привести к технической неисправности хроматографической колонки. Мы выбрали модифицированную технологию экстракции на основе депротеинизации. Для получения более концентрированной пробы депротеинизация проводится не с избытком растворителя, как в большинстве методик, а с объемом, равным объему пробы, и после уравнивания смеси и центрифугирования растворитель удаляется из супернатанта тем же органическим элюентом, который используется в составе подвижной фазы при хроматографировании, что приводит к увеличению концентрации антибиотика в супернатанте [10].

Доказательство специфичности. Самым первым и важным этапом валидации ВЭЖХ-методики является проверка ее специфичности. Специфичность доказана, если время удерживания на колонке (t) растворов «чистых» веществ совпадает с таковым в образцах биоматериала. При использовании диодно-матричного детектора специфичность можно также подтверждать спектральной однородностью хроматографического пика определяемого вещества, для чего разработаны специальные компьютерные программы. Если спектральная однородность хроматографического пика не доказана или время удерживания аналита в

биоматериале не совпадает с таковым «чистых» субстанций, то имеет место влияние другого вещества и необходимо изменить условия хроматографирования или способ пробоподготовки. Мы подтвердили специфичность определения совпадением времени удерживания с растворами «чистых» веществ пенициллина G и цефтриаксона (Sigma): 7,9 и 5,8 минуты соответственно. В подтверждении спектральной однородности необходимости не возникло.

Построение калибровочной кривой и проверка линейности. Согласно рекомендациям ИСН необходимо исследовать не менее 5 растворов с разными концентрациями в области применения методики (80–120% ожидаемого диапазона концентраций). Мы готовили стандартные растворы на основе «чистых» веществ, используя соответствующую биологическую матрицу (плазма крови, ЦСЖ). Строили калибровочную кривую методом линейной регрессии, ориентируясь на площадь пиков, при помощи программы ClarityChromV.2.6. Линейность определяется визуально по кривой регрессии. При наличии линейной зависимости определяются коэффициент корреляции, точка пересечения с осью Y, тангенс угла наклона кривой регрессии и остаточная сумма квадратов отклонений. Допустимые пределы отклонений: для наименьшей концентрации линейного диапазона – не более 20%, для остальных концентраций линейного диапазона – не более 15%. В области низких и высоких значений чаще наблюдаются отклонения от линейности, обнаружить которые достаточно сложно. Для этого применяются два подхода: первый - построить график отклонений от линии регрессии в зависимости от концентрации или от логарифма концентрации. Равномерное распределение отклонений относительно прямой доказывает линейность методики. Другой подход состоит в анализе графика относительных ответов (данные сигнала, деленные на соответствующую концентрацию), построенного в логарифмическом масштабе [11]. Если наблюдаются отклонения от линейности по используемым критериям, то такая калибровочная кривая не может быть использована и необходимо введение внутреннего стандарта. Основные требования к внутреннему стандарту: не должен содержаться в организме, должен иметь структурное сходство с аналитом и близкие хроматографические характеристики и хорошо разделяться с основным веществом на данной ВЭЖХ-системе. Для ЦТ мы использовали в качестве внутреннего стандарта цефазолин [12], для БПНС поиск проводили самостоятельно, тестируя подобные по химической структуре и физическим свойствам соединения на ВЭЖХ-системе, лучшие результаты были получены при использовании карбенициллина динатриевой соли.

Предел количественного определения (LOQ, Limit of Quantitation). FDA, ИСН рекомендованы несколько способов оценки LOQ, самый распространенный – по формуле $LOQ = 10 \times \frac{SD}{b}$, где SD – стандартное отклонение сигнала, b – наклон калибровочной кривой.

Но эта формула не учитывает требования к приемлемой воспроизводимости результатов в биологических матрицах, и есть опасность получить заниженные значения LOQ на низких концентрациях аналита. Предложен метод оценки по статистическим характеристикам калибровочного графика, который дает возможность уточнить значение LOQ, учитывая требования к воспроизводимости результатов анализа [13]. Мы применили этот удобный способ дополнительной оценки LOQ, так как можно было использовать в качестве «чистых» веществ подготовленные для калибровки растворы стандартов. LOQ важен для ответа на вопрос, возможно ли определить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотика с необходимой правильностью и воспроизводимостью. Если значение LOQ превышает МИК, методика неприемлема и необходимо вернуться к выбору методики, внутреннего стандарта и пробоподготовки.

Проверка точности методики. ICH рекомендует проводить не менее трех определений на каждую из трех выбранных концентраций, чаще всего содержащих 80, 100 и 120% аналита от номинального значения. За номинальное значение мы приняли МТК, так как мы тестировали методику на приемлемость для работы в диапазоне низких значений, и точность определения МТК являлась наиболее важным параметром для валидации. Оценку проводили путем расчета процента нахождения с помощью тестируемой методики известного количества добавленного аналита и сравнения его с фактическими значениями введенной добавки. Процент восстановления при использовании концентраций 80, 100, 120%, скорректированный на 100%, должен был находиться в пределах 98–102% во всех сериях испытаний. Мы получали такой результат не во всех опытах с БПНС и ЦТ. Однако показано, что при работе с биоматрицами более важна воспроизводимость процента восстановления, оцениваемая по коэффициенту вариации, который не должен превышать 2% [14].

Проверка прецизионности методики. Прецизионность рассматривается на трех основных уровнях: сходимости (повторяемость), внутрилабораторная воспроизводимость и межлабораторная воспроизводимость. Сходимость – одна из характеристик надежности системы, что важно при работе с биологическими образцами. Для оценки сходимости используют коэффициент вариации (CV) в серии испытаний, включающей не менее 6 хроматограмм. Критерий приемлемости $CV \leq 2\%$. Каждый из образцов готовят отдельно по выбранной методике экстрагирования и хроматографируют не менее 3 раз. Максимальный срок между испытаниями зависит от практических требований к стабильности искомых веществ. Стабильность аналита в биоматериале – важный параметр валидации ВЭЖХ-методики и требует отдельной серии испытаний и оценки [14]. Содержание β -лактамов антибиотиков при разных условиях хранения снижается на 3–18% [15]. В биоматериале при

комнатной температуре и изоляции от попадания прямых солнечных лучей пенициллины стабильны в течение 3–4 часов, за это время необходимо провести все исследования. Так как большинство β -лактамов антибиотиков термолабильны, мы отказались от этапа заморозки-оттаивания.

При доказательстве внутрилабораторной воспроизводимости, то есть отсутствия систематической ошибки, используют регрессионный анализ и F-критерий Фишера [6] и показывают, что стандартные отклонения результатов испытаний, полученных в разное время, при разном порядке исследования, разными операторами, с разными реактивами статистически эквивалентны с 95% вероятностью.

Порядок оценки межлабораторной воспроизводимости приведен в Стандарте Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 5725–2002. Требуется организовать участие не менее 5 лабораторий, оснащенных аналогичным оборудованием, что является сложным и затратным процессом. Поэтому межлабораторная воспроизводимость тестируется редко.

Заключение. На основании полученного опыта разработана схема (рисунок), в структурированном виде представляющая процесс валидации ВЭЖХ-методик для определения концентрации антибактериальных препаратов для лечения сифилиса в биологических жидкостях, в которой определены и обоснованы объем и этапность процесса и систематизированы критерии. Использование схемы при планировании и осуществлении валидационного процесса облегчит анализ и принятие решения и может быть полезно и при решении других клинических задач.

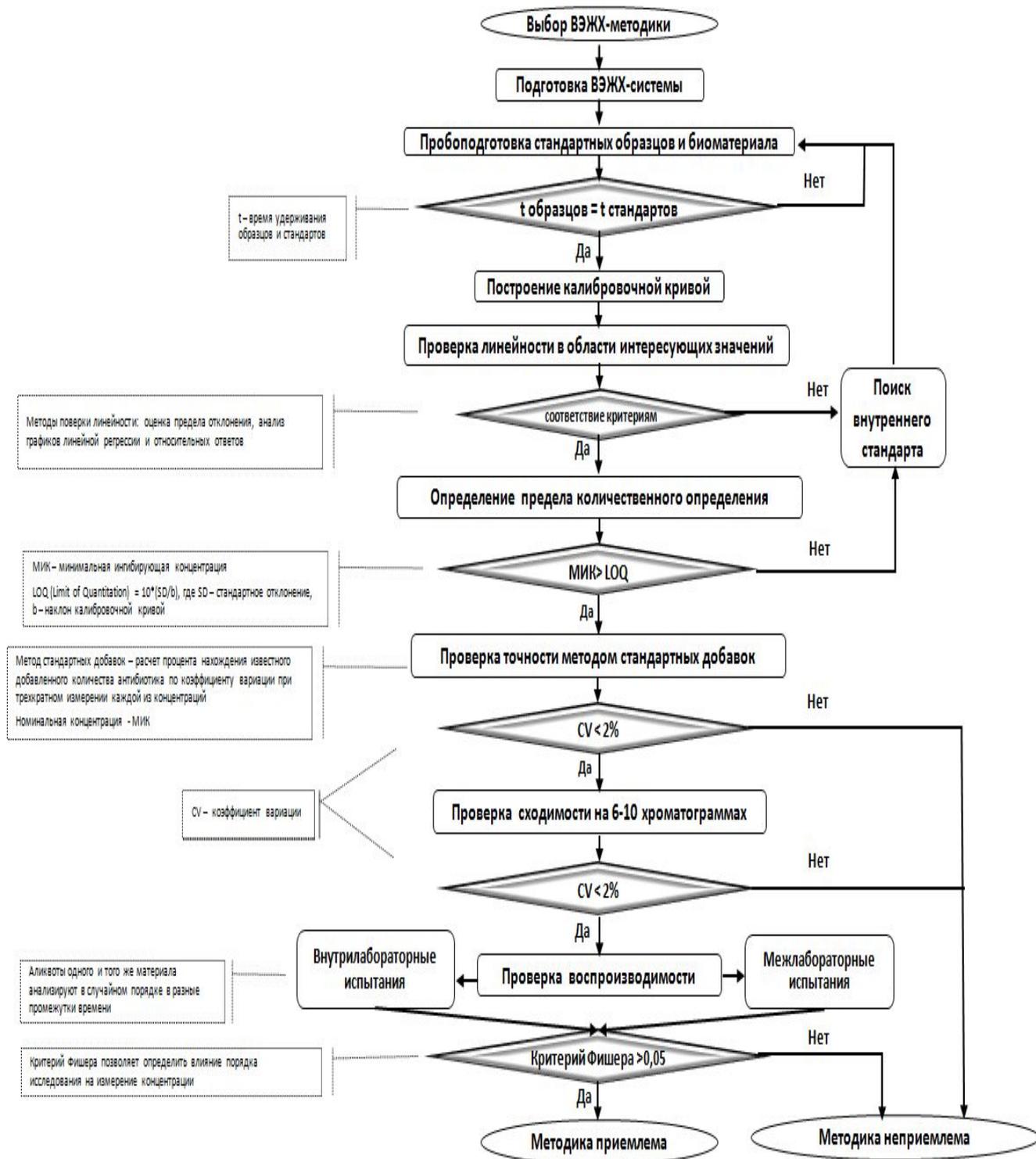


Схема валидации определения концентрации антибактериальных препаратов для лечения сифилиса в биологических жидкостях

Список литературы

1. Carlier M., Stove V., Wallis S.C., De Waele J.J., Verstraete A.G., Lipman J., Roberts J.A. Assays for therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics: A structured review. J Antimicrob

Agents. 2015. Vol. 46/4. P. 367-375.

2. Idsoe O., Guthe T., Willcox R.R. Penicillin in the treatment of syphilis. The Experience of Three Decades. Bull. WHO. 1972. Vol. 47. P. 5–68.
3. Margolis M. HPLC of penicillin antibiotic. Adv Chromatogr. 1989. no. 28. P. 333–362.
4. Дутов А.А. Биомедицинская хроматография. М.: ГЕОТАР – Медиа, 2016. 312 с.
5. Van Eeckhaut A., Lanckmans K., Sarre S., Smolders I., Michotte Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. J Chromatogr B. 2009. Vol. 877/23. P. 2198–2207.
6. Veillette J.J., Winans S.A., Forland S.C., Maskiewicz V.K. A simple and rapid RP-HPLC method for the simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in human plasma. J. Pharm Biomed Anal. 2016. Vol. 131. no 30. P.80–86.
7. Shrestha B., Ranjan N., Barij B., Sinha N. Simultaneous determination of Ceftriaxone and Tazobactam in injectables by UHPLC method. Pharm Methods. 2013. V. 4/2. no. 11. P. 46-51.
8. Дутов А.А., Пинелис И.С., Цыдендамбаев П.Б., Турчина Е.В., Хышиктуев Б.С., Никитин Д.А., Терешков П.П., Федотова А.А. Способ экстракции пенициллинов из плазмы крови // Патент РФ № 2374648, Патентообладатель ФГБОУ ВО ЧГМА. 2009. Бюл. № 33.
9. Johnsen E., Brandtzaega O., Vehusa T., Roberg-Larsena H., Bogoevac V., Ademia O., Hildahl J., Lundanes E., Wilson S. A critical evaluation of Amicon Ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. J Pharm Biomed Anal, 2016, no. 120. P. 106–111.
10. Briscoe S.E., McWhinney B.C., Lipman J., Roberts J.A., Ungerer J.P. A method for determining the free concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Chromatogr. B. 2012. Vol. 907. P. 178-84.
11. Shabir G.A. Validation of high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. J. Chromatogr. A. 2003. Vol. 987. P.57–66.
12. Kunicki P.K., Wa's J. Simple HPLC method for cefazolin determination in human serum – validation and stability testing. Journal of Chromatogr. B. 2012. Vol. 911. P. 133–139.
13. Эпштейн Н.А. Оценка предела количественного определения с учетом требований к воспроизводимости результатов анализа // Хим.-фарм. журнал. 2002. Т.36. № 11. С. 52-54.
14. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., McDowall R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. J. Pharm Biomed Anal. 1998. no.17. P.193–218.
15. Verdier M., Tribut O., Tattevin P., Tulzo Y.L, Michelet C., Bentué-Ferrer D. Simultaneous Determination of 12 β -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. Antimicrob

