

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, 20, стр. 3

2 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

3 – ООО «ЭР ЭНД ДИ ФАРМА», 115088, г. Москва, ул. Угрешская, 2, стр. 31

1 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd., 20, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

3 – R&D PHARMA Ltd., 2/31, Ugreshskaya str., Moscow, 115088, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОКСИФЛОКСАЦИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Т.Н. Комаров^{1*}, Ю.В. Медведев^{1,2}, И.Е. Шохин¹, Ю.Е. Болдина¹, А.А. Львова¹, Е.С. Мельников¹, Е.Н. Фишер^{1,2}, Р.В. Иванов³, Р.Й. Максвитис³

Резюме. Разработана методика определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с применением хроматографической системы Agilent 1290 Infinity II. Пробоподготовку проводили путем осаждения белков плазмы 50% раствором трифторуксусной кислоты. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 100–5000 нг/мл в плазме крови. Предел обнаружения методики составил 31 нг/мл. Разработанная методика может быть применена для фармакокинетических исследований моксифлоксацина, в том числе исследования биоэквивалентности.

Ключевые слова: моксифлоксацин, плазма, ВЭЖХ-УФ.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MOXIFLOXACIN DETERMINATION IN HUMAN PLASMA BY HPLC-UV METHOD

T.N. Komarov^{1*}, Yu.V. Medvedev^{1,2}, I.E. Shohin^{1,2}, Yu.E. Boldina¹, A.A. Lvova¹, E.S. Melnikov¹, E.N. Fisher^{1,2}, R.V. Ivanov³, R.J. Maksvitis³

Abstract. A new method for determination of moxifloxacin in human plasma using HPLC with UV-detection is described. The sample preparation was made by protein precipitation by 50% trifluoroacetic acid solution. The method was validated in terms of selectivity, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, carry-over and stability. The analytical range was 100–5000 ng/mL. Limit of determination was 31 ng/mL. Method could be applied to moxifloxacin determination in plasma for PK and BE studies.

Keywords: moxifloxacin, plasma, HPLC-UV.

ВВЕДЕНИЕ

Моксифлоксацин (1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-8-метокси-7-[(4aS,7aS)-октагидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил]-4-оксо-3-хинолин-карбоновая кислота (выпускается в виде гидрохлорида, м.м. 401,434 г/моль, pKa=5,69) – противомикробный препарат из группы фторхинолонов IV поколения, в основе которого лежит ядро хинолина, гетероцикла с одним гетероатомом азота пиридинового типа. Структурная формула моксифлоксацина приведена на рисунке 1.

Моксифлоксацин ингибирует топоизомеразу II и топоизомеразу IV, нарушает синтез ДНК микробной клетки. Моксифлоксацин активен в отношении большинства штаммов аэробных грамположительных микроорганизмов – *Enterococcus faecalis* (только штаммы, чувствительные к ванкомицину и гентамицину), *Staphylococcus aureus* (только метициллиночувствитель-

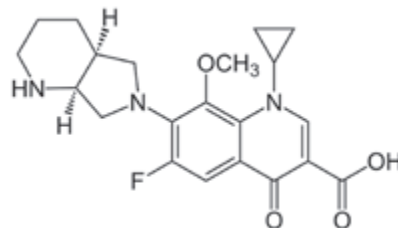


Рисунок 1. Структурная формула моксифлоксацина

ные штаммы), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus pneumoniae* (включая мультирезистентные штаммы), *Streptococcus pyogenes*; аэробных грамотрицательных микроорганизмов – *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus mirabilis*, анаэробных микроорганизмов – *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostri-*

dium perfringens, *Peptostreptococcus spp.*, а также других микроорганизмов – *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*.

Перекрестная резистентность между моксифлоксацином и другими классами противомикробных средств (включая макролиды, бета-лактамы, антибиотики, аминогликозиды, тетрациклины) не известна [1].

Для количественного определения моксифлоксацина в плазме крови применяются методы ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием после осаждения белков хлорной кислотой (предел количественного определения – 125 нг/мл) [2], флуориметрическим детектированием с предколоночной дериватизацией 4-хлоро-7-нитробензодиоксазолом (предел количественного обнаружения – 15 нг/мл) [3], УФ-спектрофотометрическим детектированием после проведения жидкость-жидкостной экстракции (предел количественного обнаружения – 0,05 мкг/мл) [4]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований препаратов моксифлоксацина. В описанных методиках в качестве внутреннего стандарта используются левофлоксацин, цiproфлоксацин. В качестве пробоподготовки применяют методы жидкость-жидкостной экстракции, осаждения белков.

Целью исследования было разработать и валидировать методику определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для проведения фармакокинетических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II, оснащенном 4-канальным градиентным насосом, автосамплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation, ver. C 01.07, Agilent Technologies, США.

Условия хроматографирования

Колонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus, 150×4,6 мм, 5 мкм, с предколоной 12,5×4,6 мм, 5 мкм.

Температура термостата колонок: 60 °С.

Температура термостата автосамплера: 15 °С.

Подвижная фаза: элюент А: раствор кислоты трифторуксусной с рН 2,5, элюент В: ацетонитрил для ВЭЖХ, градиентное элюирование (схема представлена в таблице 1).

Таблица 1.

Градиентное элюирование

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %
0,00	78	22
4,75	78	22
5,00	20	80
7,50	20	80
8,00	78	22
10,00	78	22

Скорость потока: 1,4 мл/мин.

Объем вводимой пробы: 10 мкл.

Время регистрации хроматограммы: 10 мин.

Время удерживания цiproфлоксацина (внутренний стандарт): около 2,0 мин.

Время удерживания моксифлоксацина: около 4,2 мин.

Детектирование: УФ-детектор при длине волны поглощения 291±2 нм.

Частота регистрации сигнала детектора: 2,5 Гц.

Растворы и реактивы

Моксифлоксацина гидрохлорид, субстанция-порошок; цiproфлоксацина гидрохлорид, стандартный образец USP; ацетонитрил (Scharlau, Испания, класс «для ВЭЖХ»); вода Milli-Q; кислота трифторуксусная (Acros Organic, Германия, класс «ос.ч.»).

Исходный раствор, стандартный раствор и рабочие растворы моксифлоксацина и цiproфлоксацина готовили путем растворения навески субстанции ацетонитрилом и хранили в морозильной камере при температуре от –45 °С до –50 °С.

Образцы холостой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре от –45 °С до –50 °С.

Пробоподготовка

К 600 мкл плазмы крови, помещённым в центрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл, прибавляли 50 мкл раствора цiproфлоксацина в ацетонитриле (внутренний стандарт), прибавляли 300 мкл 50%-го раствора ТФУ, встряхивали на шейкере (Reax Top, Heidolph, Германия) в течение 10 мин, затем центрифугировали (Microspin-12, Biosan, Латвия) в течение 15 мин при 14500 об/мин, после чего отбирали 600 мкл надосадочной жидкости, которую переносили в вials для хроматографа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию методики определения моксифлоксацина в плазме крови проводили на основании «Руководства по экспертизе лекарственных средств» [5], руководства по валидации биоаналитических методик FDA [6] и EMA [7] по следующим характеристикам:

- селективность;
- параметры пригодности хроматографической системы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- предел количественного определения, предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность образцов (стабильность исходного и рабочих растворов аналита; стабильность замороженного и размороженного аналита, перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру; краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре; долгосрочная стабильность аналита в матрице при низкотемпературной заморозке).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов холостой плазмы из разных источников, образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора моксифлоксацина в диапазоне концентраций от 100 нг/мл до 5000 нг/мл, образцов холостой плазмы с прибавлением внутреннего стандарта без прибавления моксифлоксацина. На хроматограммах образцов холостой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания моксифлоксацина и ципрофлоксацина (внутренний стандарт). Соответствующие хроматограммы приведены на рисунках 2 и 3.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 калибровочных образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора моксифлоксацина до получения концентраций: 100 нг/мл, 200 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл, 1500 нг/мл, 2000 нг/мл, 3000 нг/мл, 5000 нг/мл. Оценка линейности проводилась методом относительной калибровки по пику моксифлоксацина с применением ципрофлоксацина в качестве внутреннего стандарта. По полученным значениям были построены калибровочные графики (калибровочный график № 1 приведен на рисунке 4) совместно с уравнением калибровочной кривой.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблицах 2–4.

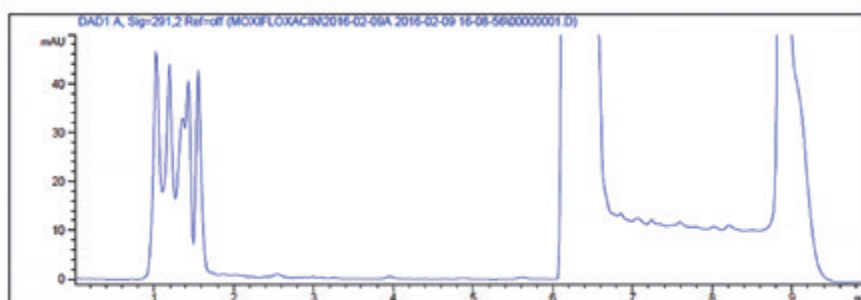


Рисунок 2. Хроматограмма образца холостой плазмы

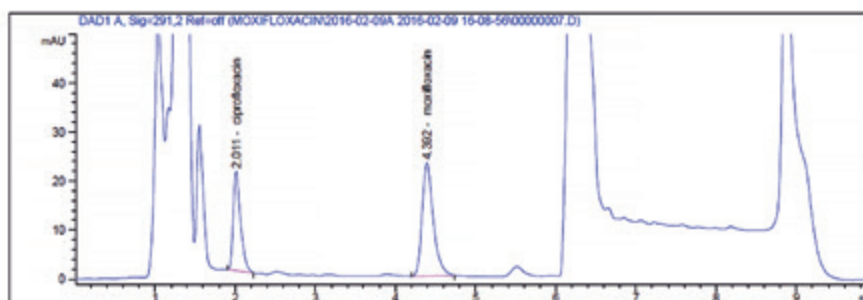


Рисунок 3. Хроматограмма образца холостой плазмы с прибавлением внутреннего стандарта (ципрофлоксацина) и моксифлоксацина (1500 нг/мл)

Таблица 4.

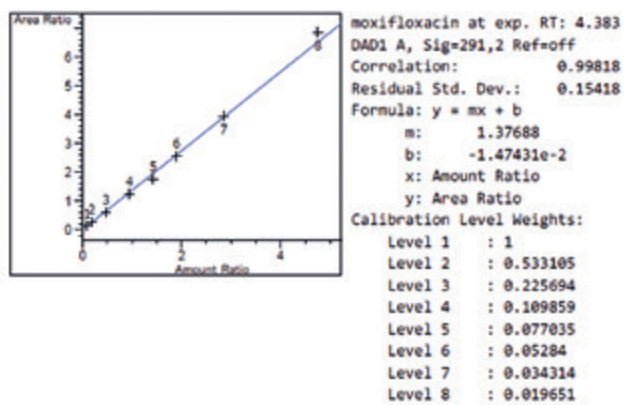


Рисунок 4. Калибровочный график № 1 зависимости отношения площадей пиков моксифлоксацина и внутреннего стандарта от отношения концентраций моксифлоксацина и внутреннего стандарта в плазме (коэффициент корреляции 0,99818)

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график № 3

Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	ε, %	Норма, не более %
100	108,163	8,16	20
200	216,273	8,14	15
500	446,072	11,52	15
1000	970,545	2,95	15
1500	1336,894	10,87	15
2000	2183,075	9,15	15
3000	2789,679	7,01	15
5000	5344,204	6,88	15

Таблица 2.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график № 1

Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	ε, %	Норма, не более %
100	114,482	14,48	20
200	204,882	2,44	15
500	468,601	6,28	15
1000	950,821	4,92	15
1500	1351,146	9,92	15
2000	1964,679	1,77	15
3000	3019,327	0,64	15
5000	5263,812	5,28	15

Таблица 3.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график № 2

Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	ε, %	Норма, не более %
100	86,487	13,51	20
200	194,546	2,73	15
500	426,118	14,78	15
1000	943,421	5,66	15
1500	1316,039	12,26	15
2000	2162,635	8,13	15
3000	2791,134	6,96	15
5000	5407,066	8,14	15

Точность и прецизионность

Проводили анализ 4 образцов холостой плазмы с прибавлением стандартных растворов моксифлоксацина до получения концентраций: 100 нг/мл, 500 нг/мл, 3000 нг/мл, 5000 нг/мл. Анализ проводили для 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня концентраций. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательностей (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %), приведенные в таблицах 5–7.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Предел количественного определения и предел обнаружения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация моксифлоксацина в плазме, для которой возможно определение моксифлоксацина со значениями RSD и ε не более 20% в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 100 нг/мл.

За предел обнаружения принималось минимальное значение концентрации моксифлоксацина, для которого обнаруживались пики на хроматограммах,

Таблица 5.

Точность и прецизионность методики (внутри цикла)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), посл. 1	найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
100	114,48	97,561	12,300	12,61	2,44
	102,07				
	100,25				
	85,93				
	85,07				
500	468,60	455,491	17,203	3,78	8,90
	478,06				
	445,57				
	436,59				
	448,64				
3000	3019,33	2948,253	101,798	3,45	1,72
	3020,12				
	3028,17				
	2834,06				
	2839,59				
5000	5263,81	5264,297	104,356	1,98	5,29
	5220,66				
	5204,16				
	5188,74				
	5444,11				

Таблица 6.

Точность и прецизионность методики (между циклами 1)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), посл. 2	найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
100	86,49	92,485	9,805	10,60	7,52
	88,43				
	87,98				
	86,95				
	87,19				
500	426,12	439,168	20,720	4,72	12,17
	422,74				
	421,77				
	422,61				
	420,99				
3000	2791,13	2845,059	129,529	4,55	5,16
	2732,96				
	2729,75				
	2725,80				
	2729,68				
5000	5407,07	5310,797	87,313	1,64	6,22
	5358,51				
	5333,20				
	5341,77				
	5345,94				

соответствующие по времени удерживания пикам моксифлоксацина. Предел обнаружения методики составил 31 нг/мл.

Стабильность

Оценивалась стабильность анализируемого вещества в составе стандартных растворов, биологической матрицы при хранении, а также после пробоподготовки.

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов моксифлоксацина (при хранении раствора в течение 4 недель при температуре

от -45 °C до -50 °C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 72 ч при анализе на следующий день). Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки.

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией моксифлоксацина 5000 нг/мл и холостой плазмы на хроматограмме холостой плазмы отсутствовали пики, соответствующие временам удерживания моксифлоксацина и ципрофлоксацина (внутренний стандарт). Перенос пробы отсутствовал.

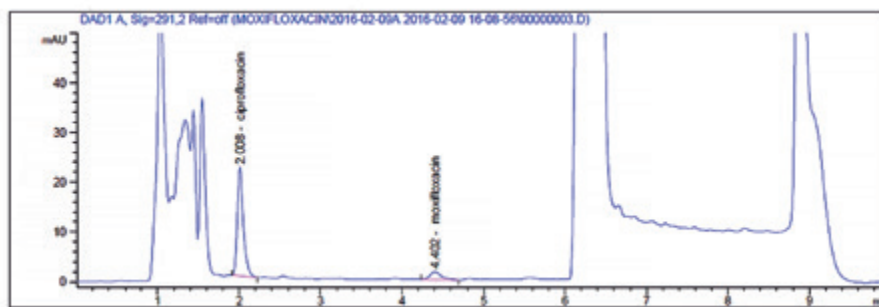


Рисунок 5. Хроматограмма образца холостой плазмы с прибавлением внутреннего стандарта (ципрофлоксацина) и моксифлоксацина на уровне ПКО

Таблица 7. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Точность и прецизионность методики (между циклами 2)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), посл. 3	найдено (нг/мл), среднее значение (n=15)	S.D. (n=15)	RSD, % (n=15)	ε, %
100	108,16	97,911	6,777	6,92	2,09
	105,76				
	110,68				
	100,91				
	118,30				
500	446,07	441,651	21,910	4,96	11,67
	448,62				
	448,07				
	447,88				
	442,45				
3000	2789,68	2824,940	87,994	3,11	5,84
	2788,81				
	2778,34				
	2782,70				
	2783,98				
5000	5344,20	5320,395	138,760	2,61	6,41
	5340,16				
	5347,38				
	5331,73				
	5334,49				

Разработана методика определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с применением хроматографической системы Agilent 1290 Infinity II. Методика была валидирована в соответствии с требованиями «Руководства по экспертизе лекарственных средств». Разработанная методика может быть применена для фармакокинетических исследований моксифлоксацина, в том числе исследования биоэквивалентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России: электронная версия. URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2812.htm (дата обращения 28.03.2016).
2. A.K. Hemanth Kumar, G. Ramachandran. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in plasma // Journal of Chromatography B 2009. V. 877. P. 1205–1208.
3. S.T. Ulu. High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin: Pharmacokinetics in human plasma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. V. 43. Is. 1. P. 320–324.
4. Y.H. Xua, D. Lib, X.Y. Liua, Y.Z. Lia, J. Luc. High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers // Journal of Chromatography B. 2010. V. 878. P. 3437–3441.
5. Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под. ред. проф. А.Н. Миронова. Т. I. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
6. 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). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2013.
7. Guideline on bioanalytical method validation (European medicines agency). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). – London. 2011.