

М. Л. Пивовар, В. М. Ёршик, В. И. Фадеев, А. И. Жебентяев

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРНИДАЗОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Предложена методика определения орнидазола в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением спектрофотометрического детектора. Пробы, содержащие орнидазол с внутренним стандартом (тинидазолом), очищают от белков высаливанием метанолом. Исследуемые вещества элюируют смесью 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 4,5) и метанола (65:35 об/об). Расход подвижной фазы составляет 1,0 мл/мин. Детектирование осуществляют при длине волны 318 нм. Концентрацию орнидазола рассчитывают по градуировочным графикам, линейным в диапазонах концентраций 0,94 – 29,9 мкг/мл.

Ключевые слова: орнидазол, ВЭЖХ, плазма крови.

ВВЕДЕНИЕ

Орнидазол обладает противопротозойной и антибактериальной активностью. Активен в отношении *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*; некоторых облигатных анаэробных микроорганизмов и некоторых грамположительных микроорганизмов. Не действует на аэробные микроорганизмы.

Орнидазол хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта. Биодоступность составляет около 90%. Максимальная концентрация в плазме достигается в течение 3 часов. Связывание орнидазола с белками составляет около 13%. Метаболизируется в печени с образованием 2-х основных метаболитов: 2-гидроксиметил- и α -гидроксиметилметаболитов. Оба метаболита менее активны в отношении *Trichomonas vaginalis* и анаэробных бактерий, чем орнидазол [1].

Структурная формула орнидазола представлена на рисунке 1.

Орнидазол представляет собой белый кристаллический порошок. Растворимость

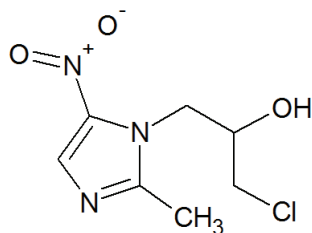


Рисунок 1 – Структурная формула орнидазола

в воде, эфире, этаноле и хлороформе составляет 2,6; 2,4; 50 и 50 % (по массе) соответственно. Показатель константы кислотности (pK_a) орнидазола равен 2,27; логарифм константы распределения ($\text{Log}P$) – 0,68 [2].

Наиболее простым из описанных способов изолирования орнидазола из плазмы крови является осаждение белков хлорной кислотой (0,7 моль/л) с последующим хроматографическим анализом проб и спектрофотометрическим детектированием при 318 нм [3, 4].

В литературе описаны и другие подходы к изолированию орнидазола. Например, для выделения орнидазола из плазмы крови авторы [5] использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. В качестве экстрагента использовали смесь диэтилового эфира и дихлорметана (60:40 об/об). Экстракты упаривали и растворяли в подвижной фазе. Хроматографический анализ выполняли на колонке Zorbax C8 300 \times 4,6 мм с использованием подвижной фазы ацетонитрил, вода и 1,0 М водный раствор дибутиламинфосфата (30:70:1). Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длинах волн 317 и 229 нм.

Близкая методика пробоподготовки описана авторами [2] для выделения орнидазола из плазмы крови. В качестве экстрагента использовалась смесь метилового и изопропилового спиртов (50:50). Хроматографический анализ выполняли на аналитической колонке, заполненной силикагелем с привитыми октадецильными группами, с подвижной фазой метанол – 0,4% раствор уксусной кислоты (50:50)

со скоростью 0,8 мл/мин, детектирование спектрофотометрическое при длине волны 316 нм.

Авторами [6] в качестве метода пробоподготовки использован метод твердофазной экстракции для извлечения орнидазола из плазмы крови и жидкость-жидкостная экстракция дихлорметаном для извлечения из образцов тканей внутренних органов. Хроматографический анализ выполнялся на аналитической колонке Lichrosphere 100RP-18 (125×4 мм, 5 мкм) с предколонкой Lichrosphere 100RP-18 (25×4 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовалась смесь фосфатного буферного раствора (pH = 3) и ацетонитрила в соотношении 88:12. Детектирование спектрофотометрическое при длине волны 313 нм.

Твердофазная экстракция также использовалась авторами [7] для изолирования орнидазола из образцов мышц. Хроматографический анализ выполнялся на колонке, заполненной силикагелем с привитыми октадецильными группами, с подвижной фазой, состоящей из воды, метанола и ацетонитрила в режиме градиентного элюирования.

Цель работы – разработать методику количественного определения орнидазола в плазме крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали рабочие стандартные образцы орнидазола (степень чистоты 99,8%) и тинидазола (внутренний стандарт, степень чистоты 99,82%), представленные заказчиком исследования.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Agilent HP 1100, оснащенном диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка – ReproSil Gold 300 C18 (250×4,6 мм, 5 мкм), температура колонки 30°C. В качестве подвижной фазы использовали 0,01 М фосфатный буферный раствор pH 4,5 – метанол (65:35 об/об). Расход элюента 1,0 мл/мин. Аналитическая длина волны 318 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество принимаемого орнидазола, согласно протоколу испытаний, составляет 1500 мг. В связи с тем, что период полувыведения орнидазола – около 13 ча-

сов, биодоступность лекарственного средства составляет 90% [8], максимальная концентрация при приеме такого количества лекарственного средства составляет 23,6–31,5 мкг/мл [8]. Таким образом, через 4 периода полувыведения следует ожидать концентрацию орнидазола не менее 1,5 мкг/мл.

В связи с тем, что ожидаемая минимальная концентрация орнидазола в плазме крови велика, а сам орнидазол с белками плазмы крови связан незначительно (11–13% [1, 8]) и поглощает свет при относительно большой длине волны (более 300 нм [2]), нами был выбран метод пробоподготовки – осаждение белков. Этот метод является достаточно простым в выполнении, а недостаток селективности компенсируется большой аналитической длиной волны и высокой концентрацией аналита.

В качестве внутреннего стандарта нами выбран тинидазол (рисунок 2).

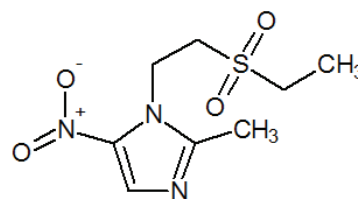


Рисунок 2 – Структурная формула тинидазола

Он обладает близким с орнидазолом строением и свойствами (pKa = 1,82 [2]; LogP = -0,27 [9]), близкими спектральными характеристиками и низкой степенью связывания с белками, что облегчает пробоподготовку методом высаливания белков.

В связи с тем, что проба может быть загрязнена большим количеством белковых компонентов матрицы, нами выбрана колонка ReproSil Gold, заполненная широкопористым сорбентом с привитыми октадецильными группами. Состав подвижной фазы подбирали таким образом, чтобы обеспечить хорошее разделение хроматографических пиков аналита с компонентами матрицы за минимальное время.

Разработанная методика количественного определения включает в себя следующие операции. В пробирки эппендорф помещают по 0,5 мл плазмы крови и 0,7 мл метанольного раствора внутреннего

стандарта тинидазола (6,1 мкг/мл). Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают в морозильную камеру (-20°C) на сутки. На следующий день пробирки центрифугируют при 7000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносят в виалы и хроматографируют.

Содержание орнидазола рассчитывают по графику зависимости аналитического сигнала от концентрации орнидазола в модельных образцах плазмы крови. Методику валидировали в соответствии с

требованиями [10].

Методика обладает удовлетворительной специфичностью: на хроматограммах различных образцов плазмы, не содержащих аналита, не обнаружено хроматографических пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания хроматографических пиков орнидазола и тинидазола (с соотношением сигнал/шум более 3). Типичная хроматограмма подготовленного образца плазмы крови, содержащей орнидазол, представлена на рисунке 3.

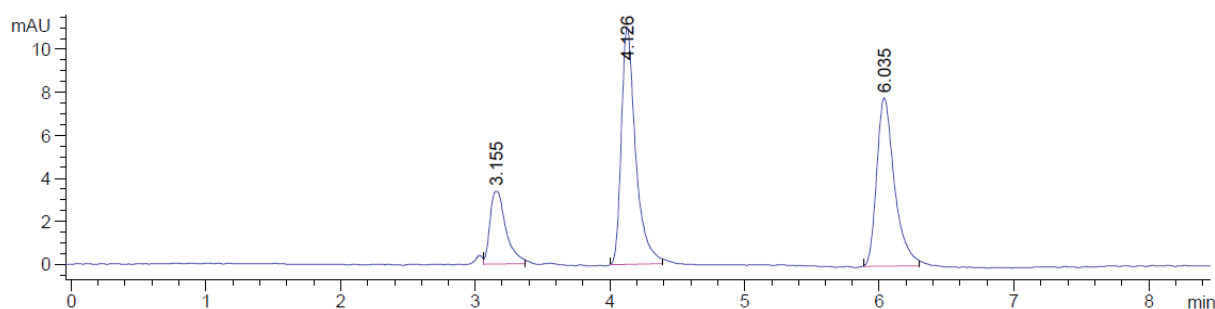


Рисунок 3 – Хроматограмма плазмы крови, содержащей орнидазол (около 4,1 мин) и тинидазол (около 6,0 мин).

Для исследования правильности и воспроизводимости методики анализировали в различные дни модельные растворы плазмы, содержащие различные концентрации орнидазола из предполагаемого диапазона определяемых содержаний. Результаты представлены в таблице.

Правильность (R , %) и воспроизводимость (RSD , %) результатов нахо-

Таблица – Результаты определения орнидазола в модельных образцах плазмы в разные дни

№	Введено орнидазола, мкг/мл		
Введено:	0,94	15,0	29,9
1	1,07	15,7	30,0
2	0,75	14,5	29,5
3	1,02	15,3	30,2
4	0,97	14,8	29,7
5	0,97	14,8	30,0
6	0,95	15,4	31,0
7	0,97	14,5	29,1
8	1,01	14,9	29,8
9	0,85	15,7	30,2
Ср. зн., мкг/мл	0,95	15,1	29,9
R , %	101,7	100,6	99,9
$t_{\text{эксп}}$	0,49	0,61	0,18

дились в пределах критериев приемлемости (85,0–115,0% и 0–15,0% соответственно). Не наблюдали статистически значимых отклонений от истинного значения определяемой величины ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{кр}}$, ($f = 8$, $P = 0,95$)).

Методика валидирована для предполагаемого, согласно литературным данным, диапазона определяемых содержаний ибупрофена 0,94–29,9 мкг/мл.

Исследуемые образцы плазмы выдерживают три цикла заморозки-разморозки. После пробоподготовки растворы устойчивы не менее 24 часов при хранении проб в автосамплере. После разморозки образцы плазмы стабильны не менее 1 часа. При хранении в жидком азоте образцы плазмы устойчивы не менее 1 месяца.

Разработанная методика использована при проведении биоэквивалентных испытаний лекарственного средства «Орнимед» (таблетки, покрытые оболочкой, 500 мг, ООО «Рубикон», Республика Беларусь) в сравнении с оригинальным лекарственным средством «Тиберал®» (таблетки, покрытые оболочкой, 500 мг, «Хоффман Ла-Рош Лтд», Швейцария).

ВЫВОДЫ

Предложена методика определения орнидазола в плазме крови методом ВЭЖХ. Все валидационные критерии, рекомендованные руководством по валидации биоаналитических методик, находились в пределах критериев приемлемости.

Разработанная методика позволяет провести испытания биоэквивалентности орнидазола и обеспечить надежное количественное определение лекарственного вещества в плазме крови человека.

SUMMARY

M. L. Pivavar, V. M. Yorshyk,
V. I. Fadeev, A. I. Zhebentyaev
DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF METHOD OF QUANTITATIVE
DETERMINATION OF ORNIDAZOLE
IN BLOOD PLASMA

A procedure for the quantification of ornidazole in plasma by high-performance liquid chromatography with UV detector has been developed. The samples containing ornidazole with internal standard (tinidazole) are purified from proteins by salting out with methanol. The drugs are eluted with a mobile phase, contain 0,01 M phosphate buffer (pH = 4,5) and methanol (65:35 v/v; 1,0 ml/min) and detection at 318 nm. The calibration graph was linear over a concentration range of 0,94–29,9 mcg/ml.

Keywords: ornidazole, HPLC, blood plasma.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник / М.: АстраФармСервис – 2006 г. – 1536 с.
2. R_M and $\log P$ values of 5-nitroimidazoles / M. C. Guerra [et al.] // J. Chromatogr. A. – 1981. – Vol. 216. – P. 93–102.
3. Groppi, A. Determination of ornida-

zole in human plasma and red blood cells using high-performance liquid chromatography / A. Groppi, P. Papa, M. Montagna // J. Chromatogr. Biomed. Appl. – 1986. – Vol. 380. – P. 447–442.

4. Stereoselective pharmacokinetics of ornidazole after intravenous administration of individual enantiomers and the racemate / Y. Chen [et al.] // Chirality. – 2006. – Vol. 18, № 10. – P. 799–802.

5. Measurement of ornidazole by high-performance liquid chromatography / H. Merdjan [et al.] // J. Chromatogr. Biomed. Appl. – 1983. – Vol. 273. – P. 475–480.

6. Pharmacokinetics and tissue penetration of a single dose of ornidazole (1,000 milligrams intravenously) for antibiotic prophylaxis in colorectal surgery / C. Martin [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1990. – Vol. 34, № 10. – P. 1921–1924.

7. Sun, H.W. Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction / H.W. Sun, F.C. Wang, L.F. Ai // J. Chromatogr. B. – 2007. – Vol. 296, № 2. – P. 296–300.

8. Sinem, Y.H. Bioavattability File: Ornidazole / Y.H. Sinem // FABAD J. Pharm. Sci. – 2004. – Vol. 29. – P. 133–144.

9. Moffat, A. C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals / A. C. Moffat. – Fourth Edition. – London: The pharmaceutical press, 2011. – 2609 p.

10. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. – 2001. – 21 p.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. раб. 8(0212) 37-00-06,
Пивовар М.Л.

Поступила 12.01.2016 г.