

В.М. Ершик, А.И. Жебентяев, В.И. Фадеев, О.А. Ершик

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОПРОЛОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Витебский государственный медицинский университет

Предложена методика определения метопролола в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением флуориметрического детектора. В процессе пробоподготовки метопролол с внутренним стандартом (биспролол) экстрагируют смесью гептан – хлористый метилен – дихлорэтан – пропанол-2 (24:10:2:1). Исследуемые вещества элюируют смесью ацетонитрил: 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в градиентном режиме. Расход подвижной фазы составляет 1,0 мл/мин. Детектирование осуществляют при длине волны возбуждения/эмиссии 225/310 нм. Нижняя граница определяемых содержаний составляет 0,6 нг/мл. Концентрацию метопролола рассчитывают по двум градуировочным графикам, линейным в диапазонах 0,6 – 20,2 нг/мл и 10,1 – 323 нг/мл.

Ключевые слова: метопролол, ВЭЖХ, плазма крови.

ВВЕДЕНИЕ

Метопролол (1-[4-(2-Метоксиэтил) фенокси]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-пропанол) применяется при артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, нарушениях сердечного ритма, гипертиреозе, для профилактики приступов мигрени. Метопролола тартрат выпускается в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой 25, 50 и 100 мг [1]. На территории Республики Беларусь зарегистрированы лекарственные средства метопролола известных производителей: Эгилор (EGIS PLC, Венгрия), Беталок ЗОК (AstraZeneca AB, Швеция), Корвитол (Berlin-Chemie AG (Menarini Group), Германия), Метопролола тартрат (Arotecnia S.A., Испания). Объем рынка метопролола на территории Республики Беларусь достаточно велик, поэтому экономически целесообразны выпуск генерического лекарственного средства метопролола и проведение испытаний биоэквивалентности с оригинальным лекарственным средством.

В литературе описывается ряд методик

определения метопролола в плазме крови. В работе [2] очистку аналита от компонентов матрицы осуществляли высаливанием белков ацетонитрилом и экстракцией липофильных веществ смесью дихлорметан-изопропиловый эфир (1:1). Внутренний стандарт при этом не использовали. В работах [3, 4] пробоподготовку осуществляли жидкость-жидкостной экстракцией из щелочной среды с использованием дихлорметана и смеси этилацетат-диэтиловый эфир (2:1), соответственно. После упаривания органической фазы досуха сухой остаток растворяли и хроматографировали. В качестве внутреннего стандарта использовали пиндолол и атенолол, соответственно. Авторы работ [5] и [6] после экстракции дихлорметаном и этилацетатом, соответственно, предложили проводить дополнительную очистку путем экстракции липофильных примесей гексаном, либо путем реэкстракции метопролола из органической фазы раствором серной кислоты. В качестве внутреннего стандарта использовали дилтиазем и биспролол. В работе [7] пробоподготовку осуществляли

методом твердофазной экстракции с использованием сорбента C_2 .

При пробоподготовке методом высаливания белков нам не удалось получить удовлетворительной сходимости результатов, что связано с сорбцией аналита на поверхности осаждаемых белков. Кроме того, отсутствие внутреннего стандарта также негативно влияет на сходимость результатов. При использовании в качестве экстрагента сложных эфиров и их смесей аналит сильно загрязнен компонентами матрицы, что увеличивает пределы определения и время, необходимое для полного разделения пиков метопролола и компонентов матрицы. Содержащаяся в экстракте вода также ухудшает метрологические характеристики методики. Применение дополнительных процедур очистки (ре-экстракция, экстракция гексаном) приводит к значительному усложнению пробоподготовки, что в сочетании с большим количеством анализируемых образцов приводит к значительным затратам времени.

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного определения метопролола в плазме крови, воспроизводимой в условиях аналитической базы биоэквивалентных испытаний и пригодной для анализа большого количества образцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали фармакопейный стандартный образец метопролола тартрата и рабочий стандартный образец бисопролола (внутренний стандарт).

Реактивы: ацетонитрил для хроматографии; натрия гидроксид, ч.д.а.; кислота трифторуксусная; кислота уксусная ледяная, о.с.ч.; гептан ч.д.а.; пропанол-2 ч.д.а.; хлористый метилен, ч.д.а.; 1,2-дихлорэтан, ч.д.а.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Waters, оснащенный флуориметрическим детектором. Хроматографическая колонка – Zorbax Eclipse XDB C-18 4,6×150 мм, зернение 5 мкм, температура колонки 30°C. Разделение проводили в градиентном режиме (таблица 1). Подвижная фаза А представляла собой 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде; подвижная фаза

В – ацетонитрил для хроматографии. Расход элюента 1,0 мл/мин. Длина волны возбуждения/эмиссии 225/310 нм. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл.

Методика пробоподготовки (жидкость-жидкостная экстракция)

В экстракционные пробирки помещают по 1,0 мл размороженной плазмы крови 1 мл 0,05М раствора натрия гидроксида, 0,200 мл рабочего раствора внутреннего стандарта (раствор бисопролола в воде, 400 нг/мл) и 3 мл экстракционной смеси (гептан – хлористый метилен – дихлорэтан – пропанол-2 (24:10:2:1)).

Содержимое пробирок перемешивают на шейкере 7 минут и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут. Органическую фазу (верхний слой) переносят в полипропиленовые пробирки и упаривают досуха в токе воздуха при температуре 35-40°C.

Содержимое пробирок растворяют в 0,100 мл подвижной фазы и 20 мкл полученного раствора хроматографируют на хроматографе, оснащенный флуориметрическим детектором.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Терапевтические концентрации при приеме 100 мг метопролола составляют от 0,03 мкг/мл до 0,28 мкг/мл. Период полувыведения – 3-4 часа (быстрые метаболизеры). Метопролол на 11% связан с белками [8].

При проведении биоэквивалентных испытаний осуществляют слежение за концентрацией лекарственного вещества в плазме крови в течение четырех периодов полувыведения. Теоретическая минимальная концентрация метопролола в плазме крови через 4 периода полувыведения должна составлять 17,50 - 1,88 нг/мл ($C_{\text{теор}} = C_{\text{max}} / 2^4$). Предполагаемый диапазон концентраций метопролола должен составлять 300 – 1,88 нг/мл.

Удельный коэффициент поглощения метопролола не высок (при 274 нм в кислой среде составляет 52 [8]), в то же время метопролол способен флуоресцировать. Поэтому в большинстве работ при исследовании фармакокинетики метопролола используют метод ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

Таблица 1 – Режим градиентного элюирования

Время, мин	А, % (об.)	В, % (об.)	Режим
0-6,0	77,0 → 63,0	23,0 → 37,0	Градиентный
6,0-7,0	63,0	37,0	Изократический
7,0-8,0	63,0 → 77,0	37,0 → 23,0	Градиентный
8,0-9,0	77,0	23,0	Изократический

В ходе предварительных исследований установлено, что наилучшая сходимость результатов наблюдается при использовании в качестве экстрагента хлористого метилена и смеси гептан – хлористый метилен – дихлорэтан – пропанол-2 (24:10:2:1) (копия системы растворителей пробирок Agilent Toxi-tubes A). В качестве оптимального экстрагента была выбрана последняя смесь, так как в отличие от хлористого метилена у нее плотность меньше плотности воды, что облегчает отбор органического слоя из экстракционных пробирок. В качестве внутреннего стандарта нами были испытаны бисопролол, атенолол и пиндолол. Атенлол практически не экстрагируется предложенной нами системой растворителей. При использовании бисопролола и пиндолаола наблюдаются сопоставимые по сходимости результаты. В качестве внутреннего стандарта нами был выбран бисопролол.

В ходе выполнения биоэквивалентных испытаний оказалось, что концентрация аналита в плазме крови некоторых добровольцев, отобранной через 4 периода полувыведения, значительно ниже теоретически рассчитанной. Поэтому в процессе работы было приготовлено два дополнительных градуировочных раствора с концентрацией метопролола 1,2 и 0,6 нг/мл.

При валидации разработанной методики по параметру правильность было обнаружено, что результаты количественного определения метопролола отягощены систематической погрешностью ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{крит}} (P=0,95; n=9)$) при использовании градуировочного графика в диапазоне концентраций 0,6 – 323 нг/мл. Для примера в таблице 2 представлены результаты расчета концентрации метопролола в плазме крови по одному градуировочному графику, в котором концентрация аналита в нижней и верхней

точках отличается более чем в 500 раз.

Поэтому при расчетах использовали два градуировочных графика: градуировочный график 1, построенный для концентраций 10,1 – 322,5 нг/мл; градуировочный график 2 – для концентраций 0,6 – 20,2 нг/мл. При анализе данных, полученных при исследовании плазмы добровольцев, концентрацию метопролола рассчитывали по градуировочному графику 1, а если она оказывалась менее 20,2 нг/мл, то расчеты проводили по градуировочному графику 2.

Результаты количественного определения метопролола в плазме крови по методу «введено-найдено» (в разные дни) представлены в таблице 3.

Правильность (R, %) и воспроизводимость (RSD, %) результатов находились в пределах критериев приемлемости (85,0-115,0% и 0-15,0%, соответственно). Относительная погрешность определения (δ , %) не превышала 15,0% (в области нижней концентрации – 20,0%). Не наблюдалось статистически значимых отклонений от истинного значения определяемой величины ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{кр}} (f=8, P=0,95)$).

Диапазон определяемых концентраций метопролола по предложенной методике составил 0,6 – 323 нг/мл, нижняя граница определяемых содержаний метопролола – не более 0,6 нг/мл.

Расчет концентрации метопролола осуществляли по двум градуировочным графикам, которые частично перекрываются в области концентраций 10,1 и 20,2 нг/мл. Поэтому нами проводилась дополнительная процедура валидации, чтобы убедиться, что результаты, рассчитанные по обоим градуировочным графикам в области перекрывания, отличаются статистически незначимо ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{кр}} (f=16, p=0,95)$). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 2 – Результаты расчета концентрации метопролола в плазме крови (P=0,95; n=9) по одному градуировочному графику

Введено, нг/мл	Найдено, мкг/мл $\bar{x} \pm \Delta x$	RSD, %	R, %	δ , %	$t_{\text{эксп}}$
323	323±5	2,4	100,2	1,59	0,25
161	160±3	2,8	99,4	1,84	0,62
80,6	79,9±2,5	4,7	99,1	3,10	0,57
40,3	40,1±0,7	2,5	99,6	1,63	0,49
20,2	20,2±0,5	3,9	100,2	2,53	0,18
10,1	10,2±0,4	6,1	101,1	4,01	0,55
5,0	5,1±0,2	5,6	100,8	3,67	0,43
2,5	3,0±0,2	7,8	117,2	5,10	5,64
1,3	1,5±0,1	7,7	122,7	5,05	7,17
0,6	0,9±0,1	9,5	139,1	6,18	8,92

Таблица 3 – Результаты количественного определения метопролола в плазме крови (P=0,95; n=9)

Введено, нг/мл	Найдено, мкг/мл $\bar{x} \pm \Delta x$	RSD, %	R, %	δ , %	$t_{\text{эксп}}$
Градуировочный график 1					
10,1	10,5±0,4	6,0	104,2	6,2	2,0
161	160±3	2,8	99,5	2,8	0,6
323	323±5	2,4	100,2	2,4	0,2
Градуировочный график 2					
0,6	0,6±0,1	12,9	103,4	15,8	0,8
10,1	10,1±0,4	6,3	99,9	6,4	0,1
20,2	20,2±0,5	3,9	100,2	3,9	0,1

Таблица 4 – Сравнение результатов расчета содержания метопролола в плазме крови по двум градуировочным графикам в области их перекрытия

Введено, нг/мл	Найдено по градуировочному графику 1 (C _{ср} 1, нг/мл)	Найдено по градуировочному графику 2 (C _{ср} 2, нг/мл)	Отношение, %	$t_{\text{эксп}}$
10,1	10,5	10,1	104,3	1,90
20,2	20,5	20,2	101,5	1,08

Методика обладает удовлетворительной специфичностью: на хроматограммах образцов плацебо не обнаружено хроматографических пиков со временами удерживания, соответствующими метопрололу и бисопрололу (внутренний стандарт).

Замороженные образцы плазмы выдерживают два цикла заморозки/разморозки, после размораживания устойчивы не менее 1 часа. После пробоподготовки образцы устойчивы не менее 18 часов при хранении в автосамплере хроматографа. При долговременном хранении образцы плазмы добро-

вольцев устойчивы не менее 36 дней. Исходный стандартный раствор внутреннего стандарта (400 мкг/мл бисопролола в метаноле) устойчив в течение 36 дней при стабилизации его с помощью добавки ледяной уксусной кислоты. Рабочий стандартный раствор внутреннего стандарта (400 нг/мл бисопролола в воде) устойчив в течение 24 часов.

Типичная хроматограмма метопролола в плазме крови представлена на рисунке 1.

Методика обладает удовлетворительной робастностью: открываемость в течение всего периода исследования находилась в пре-

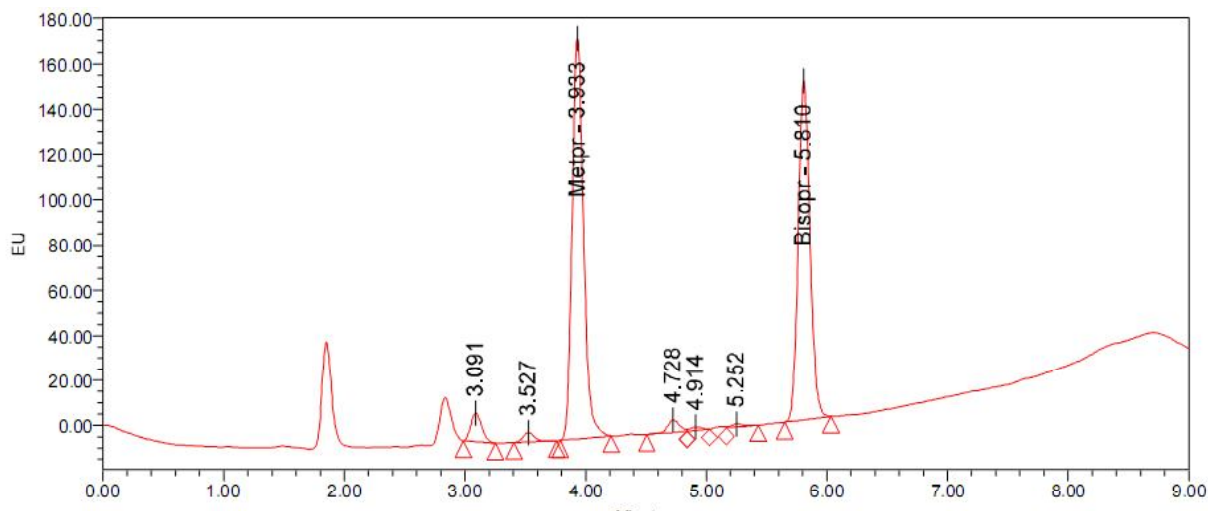


Рисунок 1 – Типичная хроматограмма образца плазмы, содержащей метопролол

делах 85-115% (в области нижней границы определяемых содержаний – в пределах 80-120%). Результаты представлены в таблице 5. Относительное стандартное отклонение угловых коэффициентов градуировочных графиков 1 и 2, полученных в различные дни, составляло 2,4 и 2,7%, соответственно. Время удерживания хроматографических пиков метопролола и бисопролола на хроматограммах, полученных в течение всего периода исследований, составляло 3,92 и 5,78, соответственно, при относительном стандартном отклонении – 0,88 и 0,78, соответственно.

Разработанная методика успешно апро-

бирована при проведении биоэквивалентных испытаний лекарственного средства Кардилок, производства ООО «Фармтехнология», в сравнении с лекарственным средством Эгилек, производства «Эгис А.О.», Венгрия.

ВЫВОДЫ

Предложена методика определения метопролола в плазме крови методом ВЭЖХ. Все рекомендованные валидационные критерии [9] находились в пределах критериев приемлемости.

Таблица 5 – Открываемость метопролола в различные дни

№ образца	Введено метопролола, нг/мл					
	0,6		161		323	
	Найдено, нг/мл	R, %	Найдено, нг/мл	R, %	Найдено, нг/мл	R, %
1	0,7	114,5	158	97,9	328	101,7
2	0,5	86,3	156	96,6	312	96,7
3	0,7	117,7	167	103,6	321	99,6
4	0,8	119,4	160	99,0	324	100,4
5	0,5	84,7	156	96,7	313	96,9
6	0,6	99,5	167	103,6	321	99,4
7	0,6	94,7	157	97,4	324	100,4
8	0,7	112,9	159	98,7	328	101,7
9	0,6	100,7	164	101,7	337	104,5
Среднее значение	0,7	103,4	160	99,5	323	100,2

SUMMARY

V.M. Yorshyk, A.I. Zhebentyaev,
V.I. Fadeev, O.A. Yorshyk
VALIDATION OF METHOD FOR
QUANTATIVE DETERMINATION OF
METOPROLOL IN BLOOD PLASMA

Reverse phase liquid chromatographic method was developed and validated for the estimation of Metoprolol in blood plasma. Metoprolol was extracted using an internal standard (Bisoprolol) and mixture of Heptane: Methylene chloride: Ethylene dichloride: Propyl alcohol-2 V/V (24:10:2:1).

Chromatographic analysis was performed on a Zorbax Eclipse XDB C-18 4,6×150mm column ID (5 micron particle size) at 30°C temperature in gradient mode, with mobile phase containing acetonitrile: 1% trifluoroacetic acid and fluorimetric detection with an excitation wavelength of 225 nm, and emission wavelength of 310 nm. The flow rate was 1.0 ml/min

The lower limit of quantification of Metoprolol is 0,6 ng/ml. The linearity of the method was in two ranges 0,6 – 20 ng/ml and 10,1 – 323 ng/ml.

Keywords: metoprolol, HPLC, blood plasma.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник / М.: АстраФармСервис – 2006 г. – 1536 с.
2. Enantioselective determination of metoprolol acidic metabolite in plasma and urine using liquid chromatography chiral columns: applications to pharmacokinetics / P.M. Cerqueira [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2003. - Vol. 783. – P. 433–441.
3. Roivas, K.L. Receptor binding assays in analysing the bioavailability and pharmacodynamic bioequivalence of active drug moieties / K.L. Roivas, P.J. Neuvonen // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 1994. – Vol. 46. – P. 237-242.
4. Yilmaz, B. Determination of metoprolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / B. Yilmaz, A. Asci, S. Arslan // J. Sep. Sci. – 2010. – Vol. 33. – P. 1904–1908.
5. Al-Saidana, S.M. Pharmacokinetic evaluation of guar gum-based three-layer matrix tablets for oral controlled delivery of highly soluble metoprolol tartrate as a model drug / S.M. Al-Saidana [et al.] // European Journal of

Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2004. – Vol. 58. – P. 697–703.

6. Qin, Li. Simultaneous analysis of tramadol, metoprolol and their metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography / Li Qin, Wang Rui // Chinese Medical Journal. – 2006. – Vol. 119. – I. 23. – P. 2013-2021.

7. Mistry, B. A sensitive assay of metoprolol and its major metabolite a-hydroxy metoprolol in human plasma and determination of dextromethorphan and its metabolite dexrorphan in urine with high-performance liquid chromatography and fluorometric detection / B. Mistry, J. Leslie // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1998. – Vol. 16. – P. 1041–1049.

8. Moffat, A.C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals / A.C. Moffat. – Second Edition. – London: The pharmaceutical press, 1986. – 1684 p.

9. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. 2001. - 21 p.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
Витебский государственный
медицинский университет,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. раб.: 8 (0212) 37-00-06.
Ершик В.М.

Поступила 12.09.2011 г.