

Определение цефиксима в плазме крови методом ВЭЖХ

В. В. ПИСАРЕВ¹, К. В. ЗАЙЦЕВА¹, Л. Б. СМIRНОВА²,
В. Г. БЕЛОЛИПЕЦКАЯ³, Д. А. КИБАЛЬЧИЧ³, И. Е. КОЛТУНОВ³

¹ Научно-производственное предприятие Пробиотек, Москва

² Государственный научный центр по антибиотикам, Москва

³ Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Росмедтехнологий, Москва

Determination of Cefixime Blood Plasma Levels by HPLC

V. V. PISAREV, K. V. ZAITSEVA, L. B. SMIRNOVA,
V. G. BELOLIPETSKAYA, D. A. KIBALCHICH, I. E. KOLTUNOV

Research and Production Company Probiotec, Moscow

National Research Centre of Antibiotics, Moscow

State Research Centre of Prophylactic Medicine, Moscow

Для изучения сравнительной фармакокинетики препаратов Цефидексор (капсулы по 100 мг) и Супракс (капсулы по 400 мг) был разработан ВЭЖХ метод с УФ-детектированием количественного определения цефиксима (действующее вещество в препаратах) в плазме крови человека. Воспроизводимость результатов, полученных данным методом с учётом критерия приемлемости, достигается во всем интервале концентраций (0,06—10 мкг/мл). Точность и правильность метода также соответствует критериям приемлемости. Нижний предел количественного определения цефиксима — 0,06 мкг/мл. Фармакокинетическое исследование проводилось открытым перекрёстным рандомизированным способом. По полученным результатам рассчитаны фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых препаратов. Статистический анализ параметров фармакокинетики показал биоэквивалентность Цефидексора и Супракса.

Ключевые слова: цефалоспорины, цефиксим, плазма крови человека, ВЭЖХ метод.

For comparative study of the pharmacokinetics of Cemidexor (capsules of 100 mg) and Suprax (capsules of 400 mg), a method of HPLC with quantitative determination of cefixime (the active substance in the drugs) in the blood plasma of patients with UV detection was developed. The data reproducibility with an account of the admissibility criterion was observed within the interval of all the concentrations (0.06—10 mcg/ml). The accuracy and correctness of the method also corresponded to the admissibility criteria. The lower limit of the quantitative determination of the cefixime blood plasma levels was 0.06 mcg/ml. The pharmacokinetics was studied with the open crossed randomized method. The results were used for calculation of the pharmacokinetic parameters required for estimation of the bioequivalence of the drugs. The statistical analysis of the pharmacokinetic parameters showed that Cemidexor and Suprax were bioequivalent.

Key words: cephalosporins, cefixime, human blood plasma, HPLS.

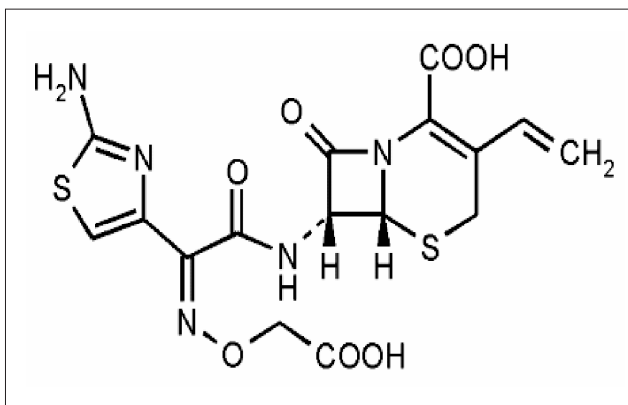
Введение

Цефиксим является полусинтетическим антибиотиком для перорального применения и относится к цефалоспорином III поколения. Данное вещество ингибирует синтез пептидогликана — основного структурного компонента клеточной стенки бактерий. Проявляет устойчивость к действию бета-лактамаз. Имеет активность в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Цефиксим характеризуется широким спектром антибактериального действия, высокой эффективностью и безопасностью при применении у детей с 6 месяцев. После приёма внутрь абсорбируется 40—50% цефиксима (независимо от приёма пищи). Максимальная концентра-

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ, 2009, 54; 7—8



[6R-[6альфа,7бета(Z)]]-7-[[[2-Амино-4-тиазолил] [(карбоксиметокси)имино]ацетил]амино]-3-этил-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота

ция (C_{\max}) в сыворотке достигается через 2–6 ч. Связывание препарата с белками сыворотки составляет около 65%. Около 50% выводится в неизменённом виде с мочой в течение 24 ч. В исследованиях на животных отмечено, что цефиксим экскретируется также с жёлчью (10%). $T_{1/2}$ из плазмы не зависит от дозы и у здоровых добровольцев составляет в среднем 3–4 ч, однако может достигать 9 ч [1, 12].

Для изучения сравнительной фармакокинетики лекарственных форм требуется быстрый, чувствительный и воспроизводимый метод количественного определения цефиксима в плазме крови. К настоящему времени существует ряд публикаций, описывающих определение цефиксима в биологических жидкостях с использованием ВЭЖХ в сочетании с разными видами детектирования [2–6]. Определения количества цефиксима в плазме или сыворотке крови проводят после жидкостной экстракции, используя 6% раствор трихлоруксусной кислоты; ацетонитрил [4–6]; изопропанол [7] или смесь ацетона с хлороформом [8]. Некоторые из этих способов требуют последующего испарения растворителя, что увеличивает время пробоподготовки. Другие — не позволяют полностью осадить белок даже при увеличении объёма экстрагента, в этом случае требуется дополнительная процедура пробоподготовки. В работах [9,10] выделение цефиксима из плазмы или сыворотки авторы проводили методом твердо-фазной экстракции. Данный способ, несмотря на его преимущества перед жидкостной экстракцией, увеличивает время проведения анализа и трудно исполним в тех случаях, когда требуется провести анализ большого количества проб.

В представленной нами работе предлагается чувствительный и воспроизводимый метод ВЭЖХ с УФ-детектированием для определения цефиксима с использованием простой в исполнении жидкостной экстракции для выделения вещества из плазмы крови. В статье приводятся данные по валидации данных проведённого метода. Раз-

работанный метод был применён для изучения сравнительной фармакокинетики двух препаратов разных производителей, содержащих цефиксим в качестве активного вещества.

Материал и методы

Оборудование и реактивы. Анализ проводили на жидкостном хроматографе «KNAUER» (Германия), оснащённом градиентным насосом, автосамплером и термостатом колонок, а также спектрофотометрическим детектором (K-2501). Хроматографическая система контролировалась программным обеспечением EuroChrom 2000. Для приготовления проб использовалась микроцентрифуга 4214 «pbi International» (Италия).

Были использованы следующие реактивы: ацетонитрил I сорта (Криохром, Санкт-Петербург), триэтиламин (Merck), кислота хлорная (х. ч.) (Химмед, Германия), вода пригодная для ВЭЖХ.

Условия хроматографирования. В соответствии с формой и положением пика на хроматограммах были протестированы параметры, включающие состав и значения pH подвижной фазы, хроматографическую колонку, скорость потока и длину волны детектирования. В качестве стационарной фазы была выбрана колонка Luna 5 мкм C18(2) 4,6×150 мм (Phenomenex) с размером частиц 5 мкм. В результате эксперимента была выбрана подвижная фаза, которая содержала воду, ТЭА и HClO_4 в соотношении 1000 мл : 1 мл : 0,8 мл с pH 2,34 (буферный раствор), а также ацетонитрил в соотношении буферный раствор:органическая составляющая, 80:20.

Элюирование проводили при комнатных условиях в изократическом режиме со скоростью потока 1,2 мл/мин. Общее время анализа занимало 7 мин. Для выбора длины волны детектирования был снят спектр поглощения раствора цефиксима во всей УФ-области. Пик поглощения располагался на длине волны 280 нм, что соответствовало литературным данным.

Основные растворы. Основной раствор стандарта цефиксима (содержание вещества 85,2%) с концентрацией 1 мкг/мл был приготовлен растворением стандарта в метаноле и хранился при +4°C. Рабочие растворы готовили путём разбавления необходимых количеств основного раствора в пригодной для ВЭЖХ воде.

Калибровочные кривые были построены по результатам анализа 9 проб холостой плазмы с добавками известных количеств рабочих растворов, включая результат анализа холостой пробы.

С целью оценки метрологических характеристик методики тем же способом были приготовлены образцы с тремя разными концентрациями: низкая, средняя и высокая, в зависимости от интервала ожидаемых концентраций в данном исследовании.

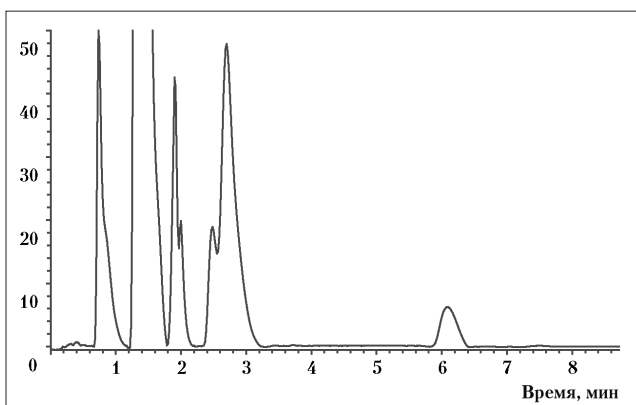


Рис. 1. Хроматограмма холостой пробы плазмы крови (blank).

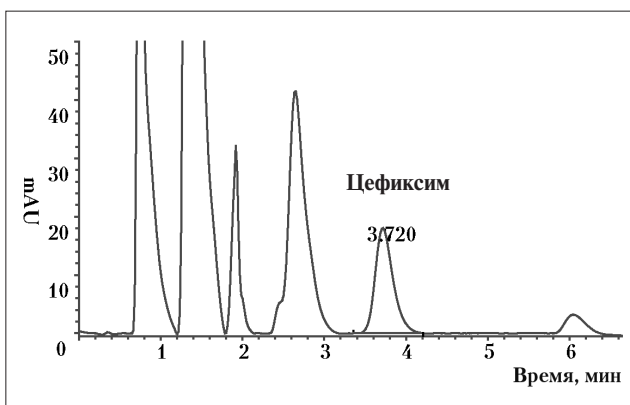


Рис. 2. Хроматограмма образца плазмы крови с концентрацией рабочего раствора 3 мкг/мл.

Подготовка проб плазмы для анализа. Для выделения цефиксима из плазмы крови и очистки исследуемого образца от белка проводили процедуру жидкостной экстракции. К замороженным образцам плазмы объемом 500 мкл добавляли 100 мкл 12% раствора хлорной кислоты и перемешивали. После центрифугирования в течение 10 мин при максимальном числе оборотов (14000 об/мин) надосадочную жидкость в объеме 50 мкл вводили в хроматограф.

Результаты и обсуждение

Полученные в ходе анализа хроматограммы холостой пробы (blank), плазмы, содержащей неизвестное количество цефиксима (пробы), а также плазмы крови добровольца с концентрацией препарата 6 мкг/мл, приведены на рис. 1, 2 и 3. Параметры хроматографического определения представлены табл. 1.

Для оценки воспроизводимости данных в разные дни было получено три калибровочные кривые в диапазоне 0,06—10 мкг/мл. Калибровочные кривые носили линейный характер во всем интервале концентраций, коэффициент корреляции R 0,999983. Воспроизводимость результатов с учетом критерия приемлемости достигается во всем интервале концентраций (табл. 2).

Для определения селективности метода были протестированы холостые пробы биологической матрицы (плазмы) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами. Анализ показал, что при количественном определении цефиксима в плазме крови человека эти составляющие влияния не оказывают.

Точность и правильность метода оценивалась по результатам параллельных анализов модель-

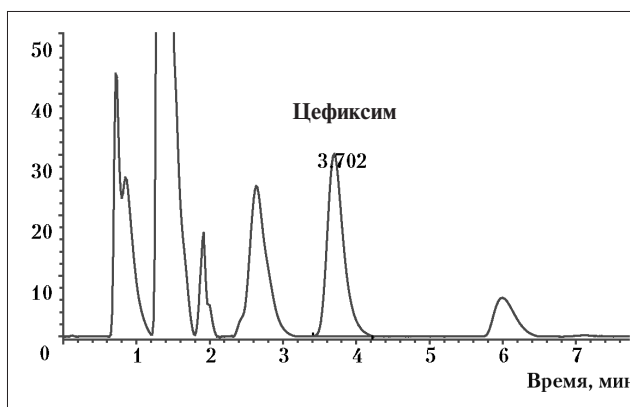


Рис. 3. Хроматограмма плазмы крови пациента.

ных смесей (содержащих 0,30; 3,00, 10,00 мкг/мл рабочего раствора цефиксима), выполненных в один день и в разные дни. Рассчитанные результаты анализа и статистические данные представлены в табл. 3. Результаты соответствуют критерию приемлемости.

Изучение фармакокинетики сравниваемых препаратов. Разработанный метод анализа крови был применен для изучения сравнительной фармакокинетики препаратов Цеמידексор (капсулы по 100 мг) и Супракс (капсулы по 400 мг). В исследование были включены 18 здоровых добровольцев. Фармакокинетическое исследование проводили открытым перекрестным рандомизированным методом в 2 этапа с интервалом между приемами препаратов 7 дней. Образцы крови в количестве 4 мл отбирали из кубитальной вены через 0,5; 1, 1,5;

Таблица 1. Параметры хроматографического определения

Параметр	Значение
Время удерживания	3,75 ± 0,05 мин
Коэффициент ёмкости	2,05
Эффективность	1411,5
Степень извлечения	71%

Таблица 2. Воспроизводимость результатов анализа

Добавленное количество цефиксима (мкг/мл)	Найденное количество (мкг/мл), среднее значение (S. D.)	Воспроизводимость, %
0,30	0,31 (0,037)*	103,9
3,00	2,98 (0,015)*	98,3
10,00	9,95 (0,11)*	99,6

Таблица 3. Точность и правильность метода

Добавленное количество цефиксима (мкг/мл)	Найденное количество (мкг/мл), среднее значение	Коэффициент вариации (CV, %)	Правильность, % (85—115%)
В один день			
0,30	0,27	4,77	90
3,00	2,90	3,51	97
10,00	10,15	1,29	101,5
В разные дни			
0,30	0,29	5,41	97
3,00	2,93	2,16	98
10,00	9,89	1,94	99,8

Таблица 4. Средние значения фармакокинетических параметров цефиксима после однократного приема капсул Цеמידексор и Супракс в дозе 400 мг (n=18)

Препарат	C_{max} , нг/мл	T_{max} , ч	AUC_{0-t} , нг*ч/мл	$T_{1/2}$, ч	C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹
Цеמידексор	2,43±0,77	3,06±0,45	12,21±4,43	3,98±1,06	0,204±0,041
Супракс	2,71±0,86	3,11±0,56	13,46±4,15	3,48±0,85	0,204±0,41

**Рис. 4. Средние фармакокинетические профили цефиксима у здоровых добровольцев после однократного приема капсул Цеמידексор и Супракс (n=18).**

2, 2,5; 3, 3,5; 4, 8 и 12 ч после приема препарата. Анализ фармакокинетических данных и оценка биоэквивалентности исследуемых препаратов проведены в соответствии с Методическими рекомендациями по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов [11].

На рис. 4 представлены средние значения концентраций цефиксима во времени (в линейных координатах) после однократного введения препаратов. Как видно, характер зависимости «концентрация — время» для сравниваемых кривых был довольно близким. Значения всех рассчитанных фармакокинетических параметров статистически достоверно не отличались, что хорошо видно из табл. 4.

Максимальная концентрация цефиксима составила для Цеמידексора $2,43 \pm 0,77$ мкг/мл и для Супракса — $2,71 \pm 0,86$ мкг/мл, время достижения

максимальной концентрации — $3,06 \pm 0,45$ ч и $3,11 \pm 0,56$ ч соответственно, а площадь под фармакокинетической кривой (от нуля до последнего забора крови) составила $12,21 \pm 4,43$ нг*ч/мл для тестируемого препарата и $13,46 \pm 4,15$ нг*ч/мл для препарата сравнения. Также были близкими средние значения $T_{1/2}$ и C_{max}/AUC_{0-t} . Среднее значение биодоступности (f') Цеמידексора по отношению к Супраксу составило $0,963 \pm 0,266$ (доверительный интервал $0,804 \div 1,010$). Значение относительной степени всасывания (f'') для изучаемых препаратов составило $0,967 \pm 0,221$ (доверительный интервал $0,819 \div 0,992$).

Заключение

Был разработан ВЭЖХ метод с УФ-детектированием количественного определения цефиксима в плазме крови человека. Валидация методики показала, что воспроизводимость результатов с учётом критерия приемлемости достигается во всём интервале концентраций (0,06 мкг/мл — 10 мкг/мл). Точность и правильность метода также соответствует критериям приемлемости. Нижний предел количественного определения цефиксима — 0,06 мкг/мл. Данный способ анализа использовался для изучения сравнительной фармакокинетики двух препаратов (Цеמידексор и Супракс). Разработанная аналитическая методика позволила определить концентрации цефиксима в плазме крови здоровых добровольцев после однократного приема препаратов внутрь на протяжении всего интервала наблюдения (12 ч). Статистически значимых различий в процессах всасывания, распределения и элиминации цефиксима при приеме капсул не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Энциклопедия лекарств// http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1410.htm.
2. European Pharmacopoeia, 3rd ed., Council of Europe, Strasbourg 1997; 838—843.
3. Liu G. L., Sha R. G., Gao S. et al. Yao. Xue. Bao., 1993; 28: 216.
4. Falkowski A. J., Look Z. M., Noguchi H., Silber B. M. J Chromatogr 1987; 422: 145.
5. McAteer J. A., Hiltke M. F., Silber B. M., Faulkner R. D. Clin Chem 1987; 33: 1788.
6. Zendelovska D., Stafilov T., Milosevski P. Bulletin of the Chem and Technolog. of Macedonia 2003; 22: 1: 39—45.
7. Demotes-Mainard F., Vincon G., Bouchet J. L. et al. Ann Biol Clin 1984; 42: 301.
8. Dell D. Chamberlain J., Coppin F. J Chromatogr 1981; 226: 431.
9. Hanson K., Madi M., Lefebvre M. A. Pharma Inc., Montreal, PQ, Canada, http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2001/1232.htm
10. Kraemer H. J., Gehrke R., Breithaupt A., Breithaupt H. J Chromatogr B Biomed. Sci 1997; 700: 147.
11. Методические указания по оценке биоэквивалентности лекарственных средств. М.: 2008.
12. Справочник Видаль, АстраФармСервис / Жучкова Т. В., Лицарева Е. А., Самойлова Е. Л., Спивак Н. Л. (ред.), М.: 2003.