

В. В. Писарев¹, Л. Б. Смирнова¹, Н. Е. Москалева¹, Ю. Б. Зверков¹, В. Г. Белолипецкая², Я. В. Суханов²

Определение азитромицина в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

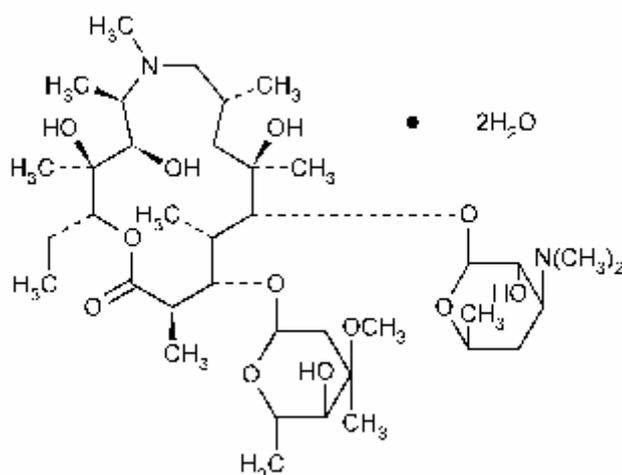
¹ ФГУП «Государственный научный центр по антибиотикам»

² Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины МЗ РФ

Разработан метод количественного определения азитромицина для ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Предел обнаружения препарата составляет 0,5 нг/мл. Метод был применен для изучения фармакокинетики и биоэквивалентности препарата Азитромицин (капсулы по 250 мг отечественного производства) в сравнении с препаратом Сумамед (аналогичная лекарственная форма производства компании «Плива, Хорватия»). Фармакокинетическое исследование проводилось открытым перекрестным рандомизированным методом. В исследование были включены 18 добровольцев. Были рассчитаны фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности изучаемого препарата. Статистический анализ параметров фармакокинетики показал биоэквивалентность препаратов Азитромицин и Сумамед.

Ключевые слова: азитромицин, метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, фармакокинетика

Азитромицин (9-деоксо-9а-аза-9а-метил-9а-гомоэритромицин (А) в виде дигидрата) – антибиотик широкого спектра действия. Наличие в его химической структуре атома азота позволяет отнести этот препарат к новой подгруппе макролидных антибиотиков – азилидам. По сравнению с другими макролидами обладает наиболее выраженным бактерицидным эффектом, способностью проникать в ткани, жидкости и клетки организма, максимальной длительностью периода полувыведения.



Азитромицин устойчив в кислой среде, благодаря чему быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте (время достижения максимальной концентрации 2-3 ч). Высокий уровень всасывания обеспечивается и липофильностью молекулы азитромицина. После приема внутрь 500 мг препарата биодоступность составляет 37%. Максимальная концентрация в сыворотке после приема этой дозы 0,4 мг/л, однако в

тканях и клетках концентрация в 10-50 раз выше, а в очагах инфекции на 24-34% больше, чем в здоровых тканях и коррелирует со степенью воспалительного отека.

Элиминация азитромицина из сыворотки проходит в два этапа: $T_{1/2}$ составляет 14-20 ч между 8 и 24 ч после приема препарата и 41 ч в интервале от 24 до 72 ч, что позволяет принимать препарат 1 раз в сутки [1].

В литературе имеется несколько публикаций, посвященных количественному определению азитромицина в биологических жидкостях методом ВЭЖХ. Так, в работах [2, 3, 4] анализ проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором и чувствительностью обнаружения препарата в плазме крови 10 нг/мл. В докладе [5] описаны условия определения азитромицина методом ВЭЖХ с детектором по флюоресценции. Чувствительность в этом случае составила 98,8 нг/мл. Авторами работы [6] приведены результаты сравнения методов ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (химическая ионизация при атмосферном давлении) и электрохимическим детектированием, использованных для количественного обнаружения препарата в плазме крови. В этом исследовании удовлетворительная точность и воспроизводимость результатов анализа наблюдалась в диапазоне концентраций 10 – 250 нг/мл и оба метода показали хорошую корреляцию между собой.

Материалы и методы

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» (США), оснащенным вакуумным дегазатором, градиентным насосом, автосамплером и термостатом колонок, а также масс-спектрометрическим детектором «Agilent 1100VL» (США) с ионизацией при атмосферном давлении в электроспрее (API-ES). При приготовлении пробы использовались вакуумный концентратор DNA mini (Австрия) и картриджи для твердофазной экстракции AccuBond II ODS-C₁₈, 100 мг производства «Agilent» (США).

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил 1-го сорта («Криохром», Санкт-Петербург), муравьиная кислота (Merck), ацетат аммония и ацетат натрия (Merck).

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Eclipse SB-C₁₈, 5 мкм, 4,6 x 150 мм (США) при температуре 70°C. Элюирование проводили в изократическом режиме. Состав подвижной фазы: ацетонитрил - 0,1 М ацетат аммония – 0,002 М ацетат натрия (60:20:20, об/об). Скорость потока 0,7 мл/мин.

В масс-спектре азитромицина полученном при ионизации вещества в электроспрее на приборе с одним квадрупольным анализатором наблюдался интенсивный пик с m/z 749,1 соответствующий протонированному молекулярному иону $[M+H]^+$ и с m/z 771,5 - иону аддукта $[M+Na]^+$. Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального выхода аддукта $[M+Na]^+$: фрагментор 200, напряжение капилляра 4500 В, температура газа 350°C, скорость 12,0 л/мин, давление небулайзера 40 psig.

Для выделения азитромицина из плазмы крови и очистки экстракта использовался метод твердофазной экстракции. Картридж предварительно промывали последовательно 1 мл ацетонитрила и 2 мл 10% водного раствора ацетонитрила. К 1 мл плазмы добавляли 0,5 мл ацетонитрила, перемешивали на vortex 2 минуты, центрифугировали 5 минут при 13 000 об/мин. Супернатант переносили в картридж. Картридж промывали 1 мл 10% водного раствора ацетонитрила, затем элюировали азитромицин 4 мл смеси ацетонитрил – 0,01 М ацетат натрия – муравьиная кислота (90 : 10 : 0,1, об/об). Полученный элюат упаривали досуха под вакуумом при температуре 60°C. Пробу растворяли в 200 мкл метанола и аликвоту 50 мкл переносили в

хроматограф. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения Chemstation фирмы «Agilent».

Разработанный метод был применен для изучения фармакокинетики и биоэквивалентности препарата АЗИТРОМИЦИН капсулы отечественного производства содержащие 250 мг азитромицина в сравнении с препаратом СУМАМЕД «Плива» (Хорватия). В исследование были включены 18 добровольцев. Фармакокинетическое исследование проводили открытым перекрестным рандомизированным методом в 2 этапа с интервалом между приемами препаратов 14 дней. Образцы крови в количестве 4 мл отбирали из кубитальной вены через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 5; 8; 12; 24; 48 и 60 часов 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 [7].

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программы «ESTRIP» модельно-независимым методом. Были рассчитаны следующие параметры: максимальная концентрация C_{max} препаратов в крови (максимальное измеренное значение); время достижения максимальной концентрации T_{max} ; площадь под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} ; площадь под фармакокинетической кривой $AUC_{0-\infty}$; период полувыведения $T_{1/2}$; среднее время удержания препаратов в системном кровотоке MRT; относительная скорость всасывания C_{max}/AUC_{0-t} . Для оценки исследуемого препарата рассчитывали f' - относительную биодоступность исследуемой лекарственной формы азитромицина по отношению к сравниваемой, определяемую отношением $AUC_{0-t,T}/AUC_{0-t,R}$ и f'' - отношение C_{max} для сравниваемых препаратов азитромицина.

Полученные экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью программы "Statistica" v 5.0 и EXCEL'97 для персонального компьютера. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение, среднее геометрическое значение, стандартное отклонение среднего результата, границы доверительного интервала, проведено парное сравнение фармакокинетических параметров. Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} (натуральные и ln-преобразованные данные).

Результаты и обсуждение

Хроматографические характеристики приведенной методики количественного определения азитромицина в плазме крови приведены в табл. 1

Таблица 1

Хроматографические характеристики метода анализа

Параметр	Значение
Время удерживания, мин	3,5
Коэффициент емкости	1,33
Число теоретических тарелок	4043
Степень извлечения, %	99,2

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения ChemStation фирмы «Agilent». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб сыворотки с добавками известных количеств азитромицина. Калибровочная зависимость носила линейный

характер в диапазоне концентраций 0.001 – 5 мкг/мл (рис. 1). График описывался линейным уравнением $Y=mx+b$, где $m=353033,27$, $b= -543,00$. Коэффициент корреляции 0,99999. Предел обнаружения 0,5 нг/мл.

В табл. 2 приведены метрологические характеристики методики количественного определения азитромицина в плазме крови по результатам 6 параллельных измерений концентрации в образцах плазмы с добавками известных количеств анализируемых веществ.

Таблица 2.

Метрологические характеристики методики определения азитромицина в плазме крови

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	S, мкг/мл	S _R	e _R
0,01	0,0097±0,0004	0,0004	0,039	0,022
0,1	0,101±0,005	0,0045	0,045	0,01
1	0,98±0,03	0,025	0,025	0,02

На рис. 2 представлены хроматограммы контрольной плазмы (А), плазмы содержащей 0,1 мкг\мл азитромицина (В), плазмы крови пациента через 2 часа после перорального приема препарата АЗИТРОМИЦИН отечественного производства (С).

На рис. 3 представлены средние значения концентрации азитромицина во времени (в линейных координатах) после однократного введения препаратов. Как видно из сравниваемых кривых характер зависимости “концентрация – время” практически не отличается. Максимальная концентрация препарата составляла для Азитромицина – 0,214±0,089 мкг/мл и для сумамеда - 0,220 ± 0,105 мкг/мл, время достижения максимальной концентрации для обоих препаратов было одинаковым 2,5 часа.

Таблица 3

Усредненные фармакокинетические параметры азитромицина после однократного приема препаратов в дозе 250 мг

	C _{max} , мкг/мл	T _{max} , ч	AUC _{0-t} , мкгч/мл	T _{1/2} , ч	C _{max} /AUC _{0-t} , ч ⁻¹
АЗИТРОМИЦИН	0,214±0,089	2,50±0,42	1,84	26,09	0,110
СУМАМЕД	0,220±0,105	2,50±0,45	1,94	24,25	0,111

Результаты расчетов фармакокинетических параметров препаратов Азитромицин и Сумамед представлены в табл.3. Из таблицы видно, что значения всех рассчитанных параметров фармакокинетики статистически достоверно не отличаются. Так, площадь под фармакокинетической кривой (от нуля до последней точки забора крови) для препарата Азитромицин составляла – 1,84±0,4 мкг ч/мл, а для препарата Сумамед – 1,94±0,49 мкг ч/мл. Остальные параметры фармакокинетики (T_{1/2}, MRT,

C_{\max}/AUC_{0-t}) также были близкими. Среднее значение биодоступности (f') препарата Азитромицин по отношению к препарату Сумамед составляет $0,96 \pm 0,11$ (доверительный интервал $0,90 \div 1,02$). Значение отношений C_{\max} (f') для изучаемых препаратов составляет $0,99 \pm 0,17$ (доверительный интервал $0,91 \div 1,108$).

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания (как по полноте, так и по скорости всасывания) препаратов АЗИТРОМИЦИН и СУМАМЕД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. В. Вышковский (ред.), Энциклопедия лекарств, ООО "РЛС-2002", Москва (2002), с. 58-59.
2. F. Kees, S. Spangler, M. Wellenbofer, J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., 812(1-2), 287 - 293 (1998).
3. D. A. Raines, A. Yusuf, M. H. Jabak, at al., Ther. Drug. Monit., 20(6), 680 – 684 (1998).
4. F. M. Shepard, G. S. Dutha, R. A Ferraina, at al., J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., 565(1-2), 321-337 (1991).
5. J. S. Torano, H. J. Guchelaar, J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., 729(1-2), 89 – 97 (1998).
6. H. G. Fonda, R. F. Schneider, Ther. Drug. Monit., 17(2), 179 – 183 (1995).
7. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов, МЗ РФ, Москва (2001).

Рис.1. Калибровочная зависимость полного ионного тока от концентрации азитромицина в плазме крови.

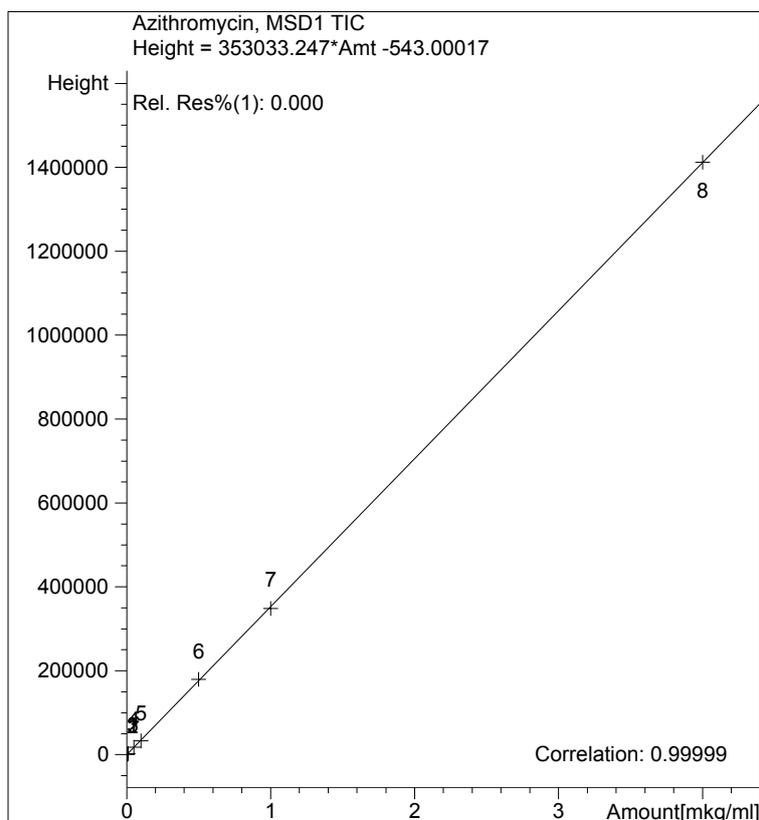
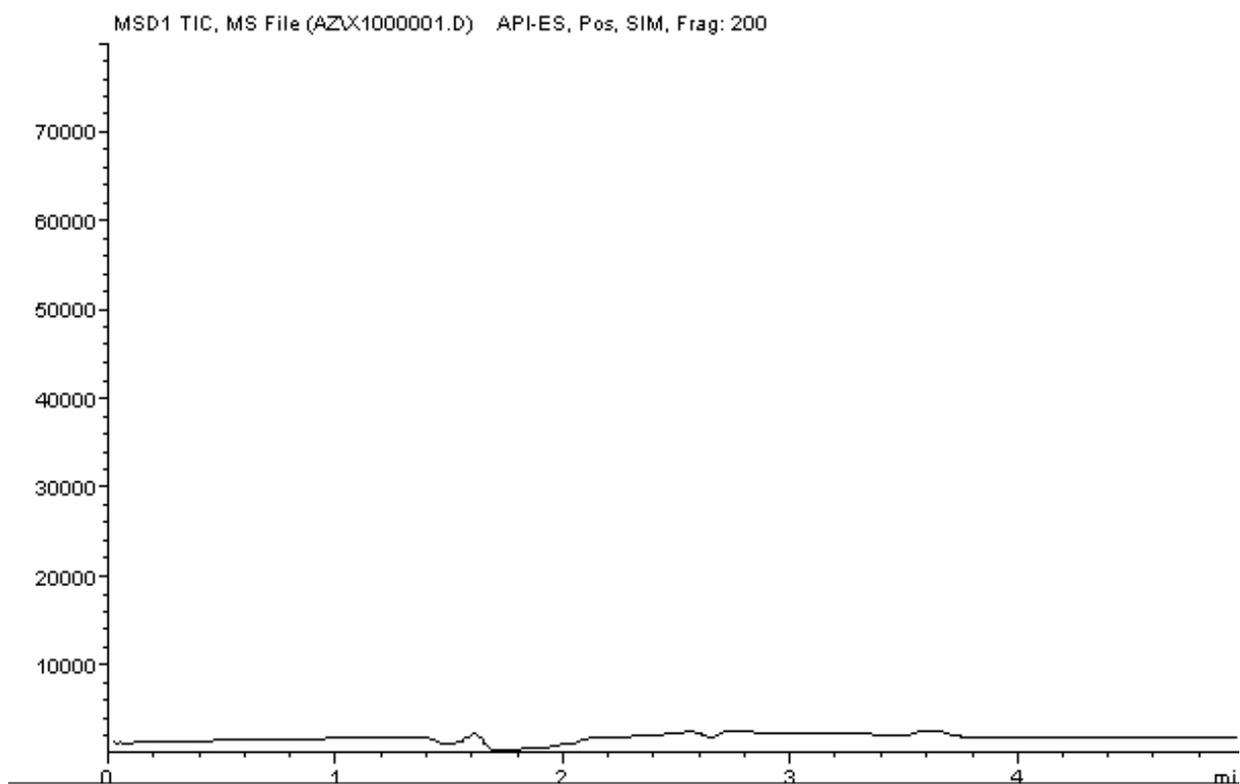


Рис.2 Хроматограмма контрольного образца плазмы крови пациента (А), образца плазмы крови с добавкой азитромицина для создания концентрации 0,1 мкг/мл (В) и хроматограмма плазмы крови пациента через 2 часа после перорального приема исследуемого препарата азитромицина в дозе 250 мг (концентрация азитромицина 0.368 мкг/мл)(С).



Время, мин
А

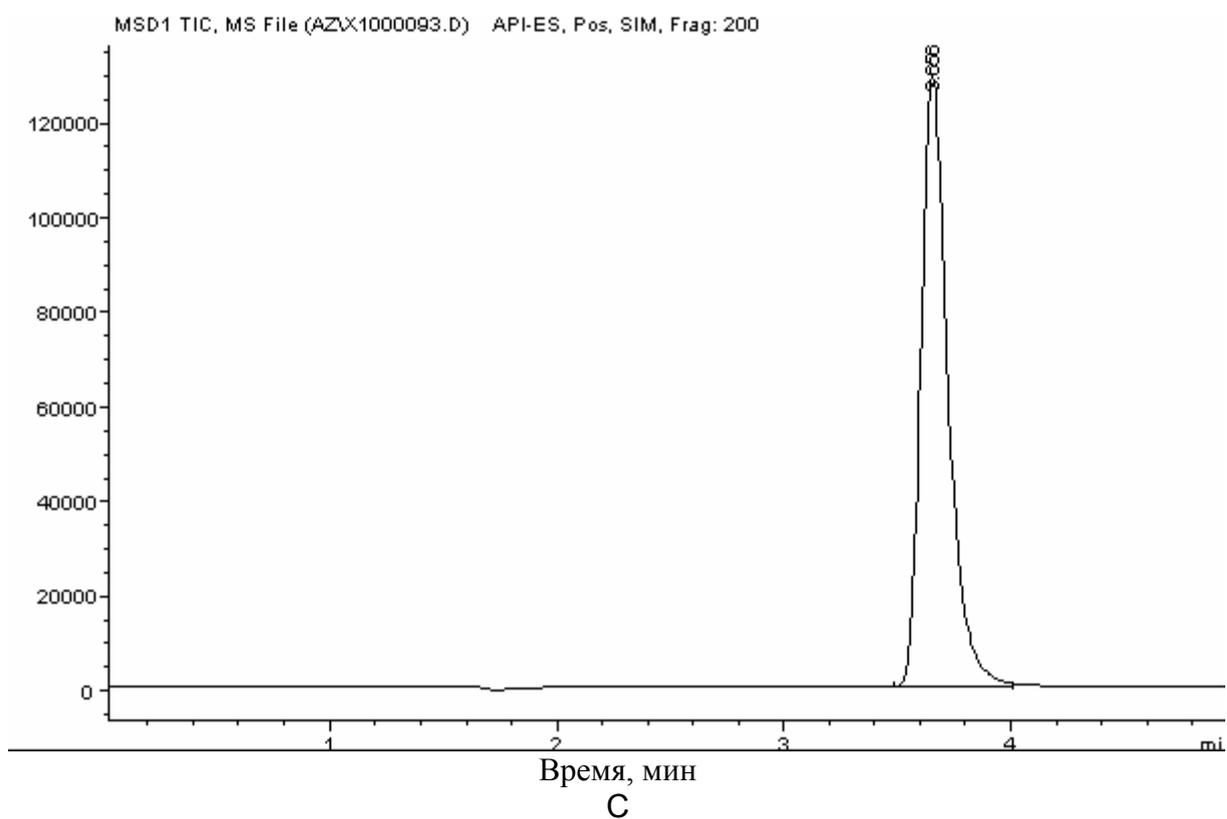
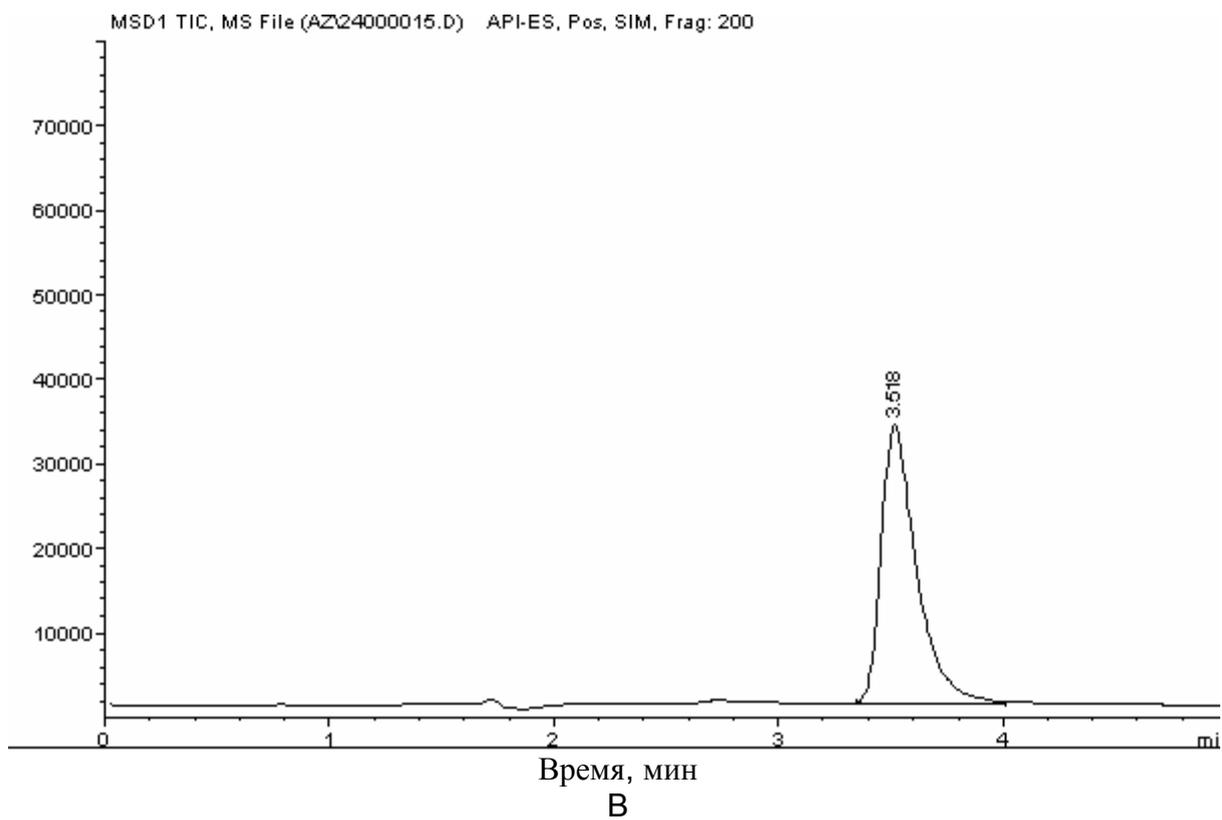


Рис.3. Средние фармакокинетические кривые АЗИТРОМИЦИНА и СУМАМЕДА.

