

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

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

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.

Азитромицин (9-деоксо-9 α -аза-9 α -метил-9 α -гомоэритромицин (A) в виде дигидрата) — антибиотик широкого спектра действия. Наличие в его химической структуре атома азота позволяет отнести этот препарат к новой подгруппе макролидных антибиотиков — азалидам. 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 флюoresценции. 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 электро-

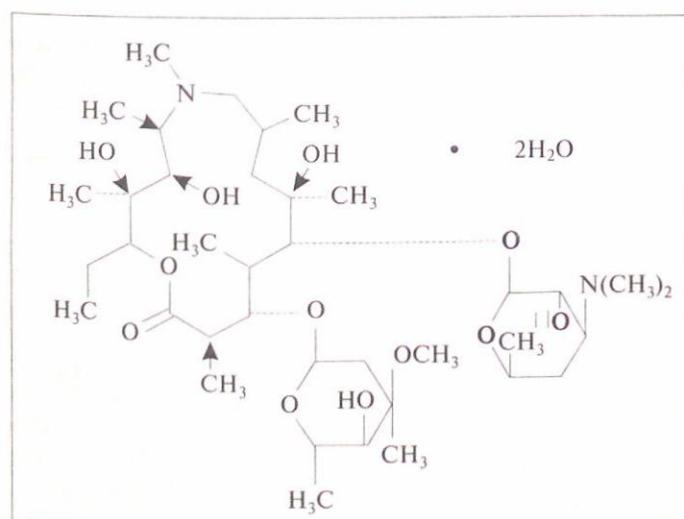


Таблица 1

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

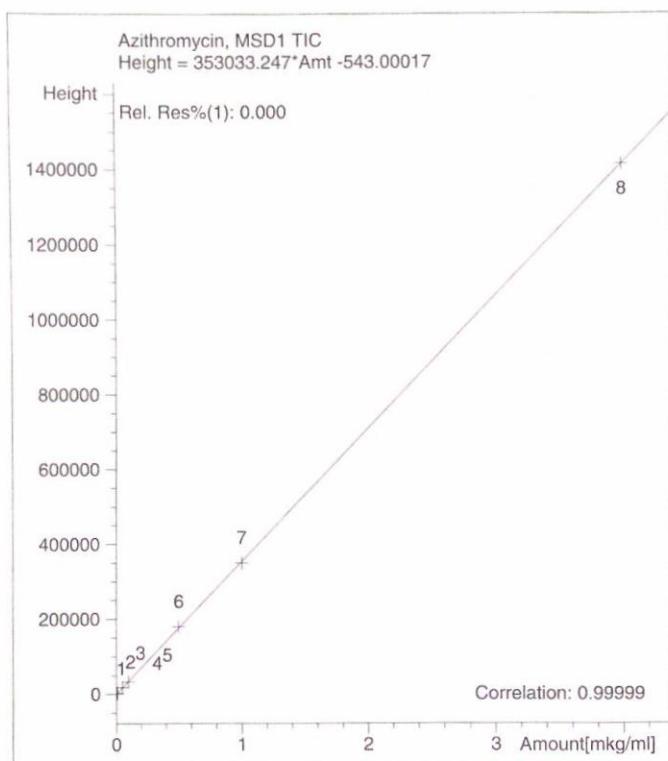


Рис. 1

Хроматографические характеристики приведенной методики количественного определения азитромицина в плазме крови

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

AccuBond II ODS-C₁₈, 100 мг производства «Agilent» (США).

В работе использовали следующие реагенты: 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 электроспире 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

химическим 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, автосamplerом и терmostатом колонок, а также масс-спектрометрическим детектором «Agilent 1100VL» (США) с ионизацией при атмосферном давлении в электроспире (API-ES). При подготовлении пробы использовались вакуумный концентратор DNA mini (Австрия) и картриджи для твердофазной экстракции

Таблица 2

Метрологические характеристики методики определения азитромицина в плазме крови

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	s, мкг/мл	sR	eR
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

Таблица 3

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

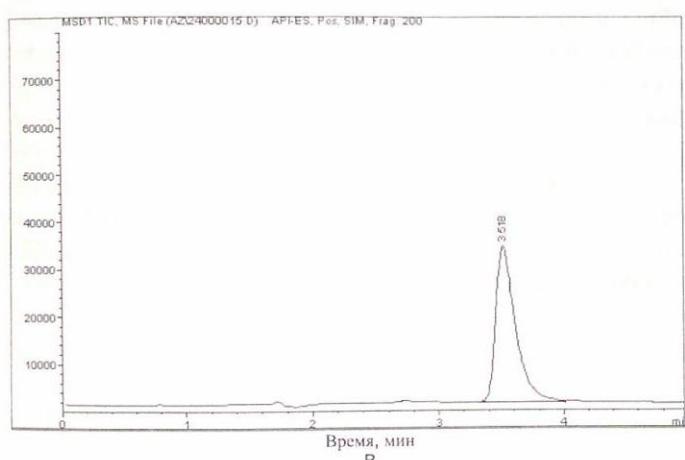
Препарат	C _{max} , мкг/мл	T _{max} , ч	AUC _{0-t} , мкг·ч/мл	T _{1/2} , ч	C _{max} /AUC _{0-t} , ч ⁻¹
АЗИТРОМИЦИН	0,214±0,089	2,50±0,42	1,84	26,09	0,110
СУМАМЕД	0,220±0,105	2,50±0,45	1,94	24,25	0,111

Puc, 2

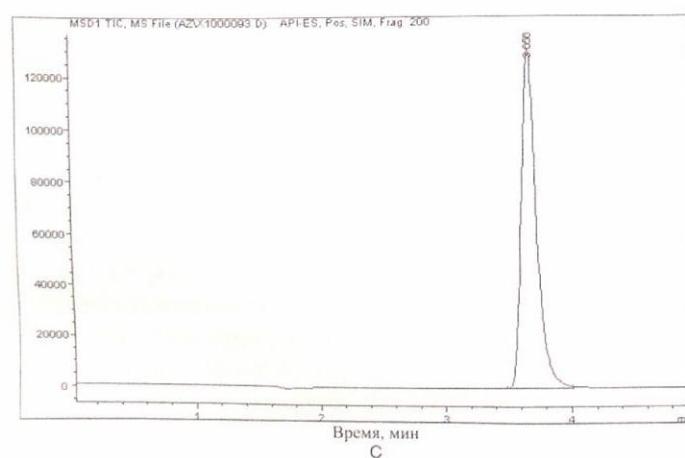
Хроматограмма контрольного образца плазмы крови пациента (A),
образца плазмы крови с добавкой азитромицина для создания
концентрации 0,1 мкг/мл (B) и хроматограмма плазмы крови пациента
через 2 часа после перорального приема исследуемого препарата
азитромицина в дозе 250 мг (концентрация азитромицина
0,368 мкг/мл)(C).



Время, мин



Время, мин



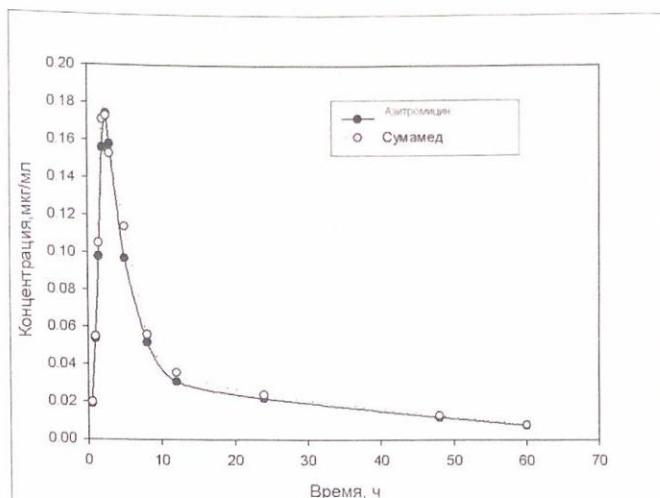
Время, мин
с

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

Puc.3

Средние фармакокинетические кривые АЗИТРОМИЦИНА и СУМАМЕДА.



фармакокинетики и биоэквивалентности препарата **АЗИТРОМИЦИН** капсулы отечественного производства содержащие 250 мг азитромицина в сравнении с препаратом **СУМАМЕД®**, фирма «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 максимальных концентраций $C_{max,T}/C_{max,R}$.

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.

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.

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 – $0,214 \pm 0,089$ мкг/мл и для СУМАМЕДА – $0,220 \pm 0,105$ мкг/мл, время достижения максимальной концентрации для обоих препаратов было одинаковым 2,5 часа.

Результаты расчетов фармакокинетических параметров препаратов АЗИТРОМИЦИН и СУМАМЕД представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что средние 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 – $1,84 \pm 0,4$ мкг·ч/мл, а для препарата Сумамед – $1,94 \pm 0,49$ 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 $0,90 \div 1,02$). Среднее значение отношения максимальных концентраций (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. Вышковский Г. В. (ред.). Энциклопедия лекарств, ООО «РЛС-2002», Москва (2002), с. 58-59.
2. Kees F., Spangler S., Wöllenhofer M., Chromatogr J. B: Biomed. Appl., 81(21-2), 287 – 293 (1998).
3. Raines D. A., Yusuf A., Jabak M. H. et al., Ther. Drug. Monit., 20(6), 680 – 684 (1998).
4. Shepard F. M., Dutha G. S., Ferraina R. A. et al., J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., 565(1-2), 321-337 (1991).
5. Torano J. S., Guchelaar H. J., J. Chromatogr. B: Biomed. Appl., 729(1-2), 89 – 97 (1998).
6. Fonda H. G., Schneider R. F., Ther. Drug. Monit., 17(2), 179 – 183 (1995).
7. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов, МЗ РФ, Москва (2001).