

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФКВІНОМУ СУЛЬФАТУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ПОРОСЯТ З ВИКОРИСТАННЯМ ВЕРХ/ДМД

С. М. Мелікян, канд. біол. наук,
Н. В. Біронт, канд. біол. наук,
О. М. Паздерська, старший науковий співробітник,
Г. Л. Мисько, науковий співробітник,
Д. В. Янович, д-р с.-г. наук

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
smelikyana@scivp.lviv.ua

У статті представлено розроблена методика визначення цефквіному сульфату в плазмі крові поросят призначений для клінічних та фармацевтичних досліджень ветеринарних препаратів на його основі. Білки плазми крові двічі осаджували розчином трихлороцтової кислоти. Надосадову рідину додатково очищали серією твердофазної екстракції. Розділення проводили на колонці Kinetex EVO C18 з оберненою фазою з використанням ацетонітрилу та 0,1 % розчину трифтороцтової кислоти, як рухомої фази. Градієнтний режим елюції проводили протягом 10 хв за швидкості потоку 1,4 мл/хв. Час утримання піку цефквіному – 4,2 хв. Специфічність аналітичної методики перевіряли за порівняння хроматографічного розділення зразка плазми крові збагаченого стандартним розчином цефквіному сульфату та контрольного зразка плазми крові. Процедура підготовки навантажених зразків плазми крові для побудови калібрувального графіку описана в статті. Розглянуто метрологічні характеристики методик: «повернення» і «коефіцієнт варіації», відповідно до критеріїв Директиви Ради 2002/657/Є. Середній витяг з навантажених зразків плазми крові у межах 0,1–2,0 мкг/мл цефквіному сульфату становить 102,3 %. Метод є лінійним у діапазоні концентрацій 0,1–4,0 мкг/мл цефквіному сульфату. Коефіцієнт кореляції для методики визначення становить 0,9998. Результати, отримані за дослідження лінійності цієї методики, використовувались для оцінки правильності та збіжності. Точність вимірювань оцінювали, досліджуючи відомі кількості аналіту, додані до контрольних зразків плазми крові. Дані повернення є прийнятними, оскільки вони знаходяться в межах $\pm 10\%$ від цільового значення. Методика характеризується достатньою збіжністю (точністю). Оцінку проміжної прецизійності визначення цефквіному сульфату оцінювали у три різні дні аналізу. Межа виявлення цефквіному сульфату становить 0,05 мкг/мл і межа кількісного визначення 0,1 мкг/мл плазми крові. Основними перевагами розробленої методики є селективність та висока чутливість. Середнє значення коефіцієнту варіації для кожного аналізу становило $< 10\%$. Процедура була підтверджена, а потім застосована для визначення цефквіному сульфату у плазмі крові поросят, отриманій для вивчення фармакокінетики препаратів. Розроблена ВЕРХ/ДМД методика можна використовувати для дослідження фармакокінетики ветеринарних препаратів на основі цефквіному сульфату.

Ключові слова: ЦЕФАЛОСПОРИН, ХРОМАТОГРАФІЯ, ЗБАГАЧЕНІ ЗРАЗКИ, ВАЛІДАЦІЯ.

DEVELOPMENT OF METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF CEFQUINOME SULFATE IN PIGLETS BLOOD PLASMA USING HPLC/DMD

S. Melikyan, N. Biront, O. Pazderska, G. Mysko, D. Yanovych

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
Donetska str., 11, Lviv, 79019, Ukraine
smelikyan@scivp.lviv.ua

This manuscript presents a developed method for determining cefquinome sulfate in piglets blood plasma intended for clinical and pharmaceutical research of veterinary drugs based on it. Blood plasma proteins were precipitated twice with a solution of trichloroacetic acid. The supernatant was further purified by a series of solid-phase extraction. Separation was performed on an inverted phase Kinetex EVO C18 column using acetonitrile and 0,1 % trifluoroacetic acid solution as the mobile phase. The gradient mode of eluents was used during 10 min at a flow rate of 1,4 ml/min. The peak retention time of cefquinome sulfate is 4,2 min. The specificity of the analytical method was checked by comparing the chromatographic separation of a sample of blood plasma enriched with a standard solution of cefquinome sulfate and a sample of blood plasma placebo. The preparing loaded blood plasma samples procedure for building a calibration graph is described in the article. The validation parameters of the method "recovery" and "coefficient of variation" were considered in accordance with the criteria of Council Directive 2002/657/EC. The procedure of sample preparation of fortified blood plasma to construct calibration graph is described in the manuscript. The mean recovery from fortified blood plasma samples in the range of 0.1-2.0 µg/ml cefquinom sulfate was 102.3 %. The method is linear in the concentration range of 0.1 – 4.0 µg/ml of cefquinome sulfate. The correlation coefficient for the determination method is 0.9998. The results obtained in the study of the linearity of this technique were used to estimate the correctness and convergence. The accuracy of the measurements was evaluated by examining the known amounts of analyte added to the control blood plasma. Recovery data are acceptable because they are within ± 10% of the target value. The method has sufficient convergence (accuracy). The evaluation of the intermediate precision of cefquinome sulfate determination was assessed on three different days of analysis. The limit of detection for cefquinom sulfate is 0.05 µg/ml and limit of quantification - 0.10 µg/ml. The average CV for each compound was <10%. The procedure was confirmed and then applied to determination cefquinome sulfate in the pig blood plasma obtained during the study of the pharmacokinetics of the veterinary drug. The HPLC/DMD method can be used for study of the pharmacokinetics of the veterinary drug.

Keywords: CEPHALOSPORIN, CHROMATOGRAPHY, FORTIFIED SAMPLES, VALIDATION.

Цефквіном – антибіотик, який належить до групи цефалоспоринів. Він пригнічує синтез стінки мікробної клітини. Бактерицидно діє проти грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Цефквіном належить до IV покоління цефалоспоринів, є стійким до дії бактеріальної β-лактамази, фермента що нейтралізує дію антибіотиків. Цефквіном схвалений для лікування захворювань дихальних шляхів, гострого маститу та гнилі у великої рогатої худоби, септицемії телят, респіраторних захворювань свиней, синдрому метриту-мастити-агалакції у свиноматок, септицемії лошат і захворювань дихальних шляхів у коней (Limbert et al., 1991). Період напіврозпаду цефквіному для свиней становить 9 годин. Виводиться з організму, в основному, із сечею (X B Li et al., 2009).

На ринку України цефквіном представлений ветеринарними препаратами вітчизняного та зарубіжного виробництва: Сульфацеф (суспензія для ін'єкцій), виробництва ТОВ «Бровафарма», Кобактан 2,5 % (суспензія для ін'єкцій) MSD Animal Health, Цебактал (суспензія для ін'єкцій) ТОВ «АТ Біофарм», Метрилек (суспензія для внутрішньоматкового

застосування) ТОВ «АТ Біофарм», Мاستилек (суспензія для інтрацестерального застосування), виробництва ТОВ «АТ Біофарм» (Ishchenko, M.P. & Kanivets, N.S., 2021).

Згідно із Законом України «Про ветеринарну медицину» (Zakon Ukrainy «Pro veterinary medytsynu», 2022) та Наказом ДКВМ «Про затвердження форм заяв, текстової інформації на пакуванні (маркування), переліку матеріалів реєстраційного досьє та порядку його формування» (Nakaz derzavnoho komitetu veterinary medytsyny № 133, 2008), у реєстраційному досьє ветеринарних лікарських засобів мають міститись матеріали про якість, ефективність та безпечність. У випадку генеричного препарату в досьє описують порівняльне дослідження його фармакокінетики з референсним препаратом (встановлення біоеквівалентності). В оцінці біоеквівалентності лікарських препаратів орієнтуються на максимуми концентрацій активного фармацевтичного інгредієнта у крові, часи досягнення максимальної концентрації і площі під кривими зміни концентрації у крові. Лікарські препарати вважають біоеквівалентними тоді і тільки тоді, коли вони забезпечують однакову концентрацію діючої речовини у крові і тканинах організму.

Метою нашої роботи була розробка методики кількісного визначення цефквіному сульфату в плазмі крові поросят методом високоефективної рідинної хроматографії з діодноматричним детектуванням (ВЕРХ/ДМД) для можливості подальших клініко-фармацевтичних досліджень ветеринарних препаратів на основі цієї активної фармацевтичного інгредієнту.

Матеріали і методи. *Реактиви.* Метанол, ацетонітрил, трихлороцтова кислота, трифтороцтова кислота (for HPLC, Sigma-Aldrich), та вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore).

Картриджі для твердофазного екстрагування Bond Elut C18 50 мг/3 мл (Varian, США) або Oasis HLB 3cc 60 мг (Waters, США).

Стандарту. У розробці використовували сертифікований стандартний зразок цефквіному сульфату (Sigma Aldrich, Vetranal analytical standard). Первинні розчини стандартного зразку зберігали протягом двох місяців у щільно закритому посуді та темному місці за температури мінус 20 °С.

Обладнання. Рідинний хроматограф Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (виробництво Німеччина) з діодноматричним детектором, споряджений колонкою Kinetex EVO C18 (5 µm, 250mm x 4,6mm) фірми Phenomenex (США).

Приготування зразків. Одразу після відбору зразки крові поступали у лабораторію. Отриману після 10 хв центрифугування (3000 об/хв), плазму відбирали у поліпропіленові мікропробірки і заморожували за температури мінус 20 °С.

До 1 мл плазми крові додавали 3 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти для осадження білків. Після перемішування на вортексі та центрифугування відбирали надосадову рідину. Процедуру повторювали двічі. Надосадову рідину додатково очищали твердофазною екстракцією з наступним центрифугуванням за кімнатної температури. Надосадову рідину переносили у віали для інжекції.

Побудова калібрувального графіка. Для побудови калібрувального графіку в діапазоні від 0 до 2,0 мкг/мл цефквіному сульфату використовували контрольний (чистий) зразок плазми крові та зразки плазми навантажені стандартним розчином в концентрації 10 мкг/мл, згідно з таблицею 1. Подальшу підготовку навантажених зразків проводили, як описано вище.

Хроматографічний аналіз. Градієнтна система елюентів складається з 0,1 % трифтороцтової кислоти та ацетонітрилу (табл. 2). Швидкість потоку елюентів встановлювали 1,4 мл/хв, температура колонки 40 °С, об'єм уведеної проби 50 мкл. Час розділення – 10 хвилин. Хвиля детектування діодноматричного детектору 200-400 нм (268 нм).

Таблиця 1

Приготування зразків плазми крові об'ємом 1 мл навантажених цефквіномом сульфату для побудови калібрувальної кривої

№ зразку плазми	Концентрація цефквіному сульфату в зразку, мкг/мл	Об'єм доданого розчину цефквіному сульфату, мкл
1	0,0	0,0
2	0,1	10,0
3	0,2	20,0
4	0,5	50,0
5	1,0	100,0
6	1,5	150,0
7	2,0	200,0

Таблиця 2

Програма зміни градієнту елюентів рухомої фази за потоку 1,4 мл/хв

Час (хв)	0,1 % Трифтороцтова кислота (% об./об.)	Ацетонітрил (% об./об.)
0,0	95	5
6,3	40	60
6,9	40	60
7,4	95	5
10,0	95	5

Результати й обговорення. Для оптимізації умов розділення і кількісного визначення цефквіному сульфату в плазмі крові поросят використовували наявні літературні дані (Kamі Uney, 2011), а саме хвилю детектування діодноматричного детектора та склад мобільної фази. Першим етапом роботи було ефективне хроматографічне розділення стандартного розчину цефквіному сульфату. Початкові випробування мобільної фази проводили в ізократичному режимі комбінації ацетонітрилу та 0,1 % розчину трифтороцтової кислоти. Але оптимальне розділення отримане в режимі градієнтного елюювання від 5 до 60 % ацетонітрилу. За цих умов час утримання піку цефквіному сульфату становить приблизно 4,2 хв із загальним часом розділення 10 хв. Хроматографічну колонку було обрано на основі форми (симетрії) піку, що становила 1,07, та здатності відокремлювати цефквіном від ендогенних речовин плазми крові. Параметри придатності хроматографічної системи характеризувались кількістю теоретичних тарілок – 40000 і вище.

Оцінку придатності запропонованої методики проводили за критерієм «додано-отримано» з використанням контрольної (чистої) плазми поросят. Згідно з хроматограмами, на рисунку 1 видно, що градієнт елюентів сприяє ефективному розділенню цефквіному сульфату за незначної присутності матричних впливів, спричинених компонентами плазми крові. Отже, розроблена методика володіє специфічністю.

Валідаційні параметри розробленої методики. Для оцінки придатності розробленої ВЕРХ/ДМД методики визначення цефквіному сульфату в плазмі крові було проведено обрахунок межі детектування (LOD), межі кількісного визначення (LOQ), проміжної прецизійності, відсотка витягу (RP), межі лінійності калібрувального графіку на матриці, коефіцієнту кореляції отриманої лінійної залежності (R^2).

За результатами вимірювань збагачених зразків плазми крові з використанням комп'ютерного програмного забезпечення Chromeleon побудовано калібрувальний графік (рис. 2). У межах вибраного діапазону концентрацій, площі піків досліджуваного аналіту прямо пропорційні його концентрації у досліджуваних зразках. Коефіцієнт кореляції для методики визначення обрахований програмою становить 0,9998. Для розрахунку межі детектування (LOD), яка становить 0,05 мкг/мл, та межі кількісного визначення (LOQ), яка становить 0,1 мкг/мл, поправку на холосту пробу не вводили (Mahnusona & Ernemarka, 2016).

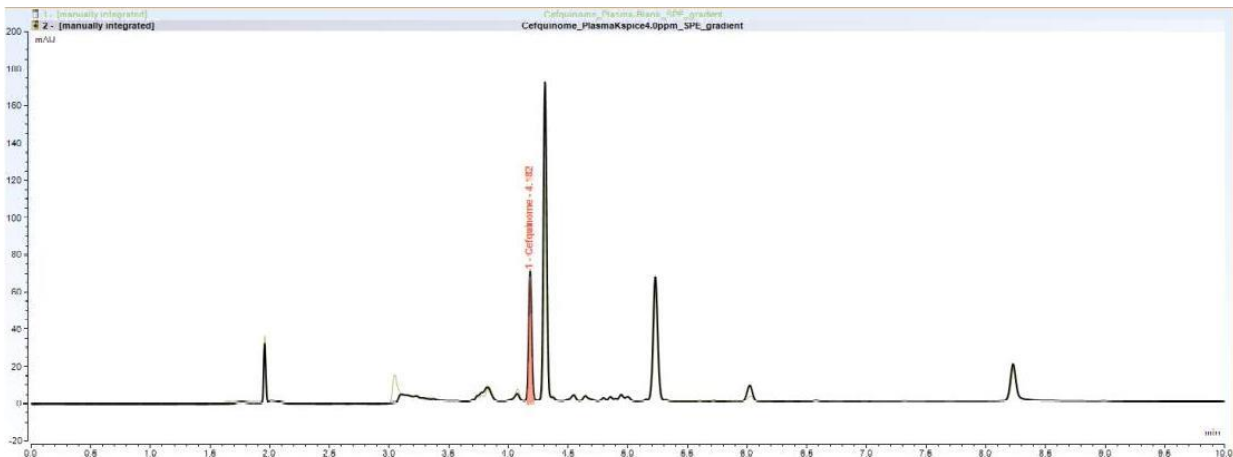


Рис. 1. Хроматограма контрольного (чистого) зразка плазми крові поросят та зразка збагаченого стандартним розчином цефквіному сульфату на рівні 4,0 мкг/мл.

Для більш повної оцінки отриманих даних було обчислено коефіцієнт варіації (CV), який характеризує відносний ступінь відхилення виміряних значень від середнього арифметичного. Для цього використано загальноприйнятий статистичний підхід для визначення залишкових кількостей (Commission Decision, 2002). Отримані результати коефіцієнту варіації для кожного рівня вмісту цефквіному сульфату свідчать про низьку мінливість варіаційного ряду і є прийнятним.

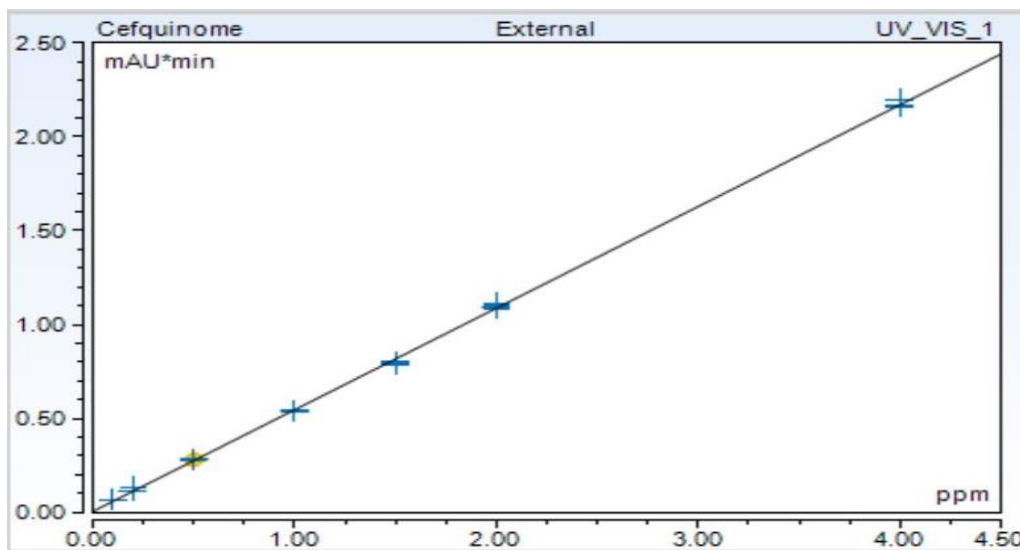


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення цефквіному сульфату в діапазоні концентрацій 0,1-4,0 мкг/мл (ppm), побудовані на матриці плазми крові.

Одним з найважливіших критеріїв кількісного аналітичного методу є правильність – ступінь близькості між середнім значенням, що отримано з серії результатів досліджень та прийнятим значенням. Даний критерій відображає, наскільки отриманий результат відповідає фактичному значенню, і для його визначення дослідники зобов'язані використовувати сертифікований референтний матеріал. У разі його відсутності дозволено використовувати спосіб додавання стандартів до чистої матриці з наступним визначенням аналіту, та відповідним розрахунком відсотку витягу (recovery percent, RP). Такі точки концентрацій включає калібрувальний графік побудований на плазмі крові для цефквіному сульфату. Результати представлені в таблиці 3.

Відсоток витягу від доданого значення цефквіному сульфату в плазмі крові

Навантаження зразка плазми, мкг/мл	Визначено аналіту, мкг/мл	Відносне стандартне відхилення, %	Відсоток витягу, %
0,1	0,1152	0,28	115,2
0,2	0,2022	0,45	101,1
0,5	0,5076	0,07	101,5
1,0	0,9820	0,42	98,2
1,5	1,4628	1,13	97,5
2,0	2,0081	0,62	100,4

Результати досліджень усіх проаналізованих навантажень є прийнятними, оскільки відсоток витягу знаходиться у межах 70-120 % за відносного стандартного відхилення не більше 20 %.

Крім того, відсоток витягу, різниця між очікуваною і отриманою концентрацією аналіту, є кількісним показником точності. Цей показник ще називають здатністю витягу розробленої методики. Згідно вимог до правильності кількісних методів (точність відповідності експериментальних результатів конкретному значенню), у разі повторних аналізів збагачених зразків, відхилення експериментально визначеного вмісту від доданого не повинно перевищувати $\pm 10\%$ (Commission Decision, 2002). Як видно з даних таблиці 3, відсоток повернення аналіту знаходиться у відповідній межі, що свідчить про точність розробленої методики.

Прецизійність методики є мірою близькості результатів між собою і характеризується стандартним відхиленням SD або відносним стандартним відхиленням RSD у відсотках для серії вимірювань. Оцінку проміжної прецизійності визначення цефквіному сульфату оцінювали у три різні дні аналізу (табл. 4). Отримані концентрації досліджуваних аналітів обраховували за калібрувальними кривими збагачених зразків плазми крові. Для розрахунку межі прецизійності використали коефіцієнт критичного діапазону $f(3)=3,3$ (Mahnusona & Ernemarka, 2016).

За розробленою методикою проаналізували вміст цефквіному сульфату у зразках плазми крові поросят, яким одноразово вводили ветеринарний препарат на основі цефквіному сульфату. Максимальна виявлена концентрація аналіту становила 5,4 мкг/мл, мінімальна виявлена концентрація – 0,02 мкг/мл.

Отже, з наведених даних видно, що методика дозволяє визначити низькі концентрації цефквіному сульфату та володіє високою чутливістю. Тобто, є високоспецифічна та високочутлива, що дозволить належним чином провести клінічні дослідження лікарських ветеринарних препаратів на основі цефквіному сульфату.

Таблиця 4

Аналізування статистичних даних щодо проміжної прецизійності результатів визначення цефквіному сульфату (мкг/мл)

Внесено	Отримано			Середнє арифметичне, $\Sigma_{i=1}^3$	Відхилення кожного значення від середнього арифметичного (Δa)			Середня похибка середнього арифм. значення, σ_r	Абсолютна різниця між найменшим і найбільшим	Межа збіжності, $r = f(3) \cdot \sigma_r$	Критерій прийнятності результату, $ a < r$
	1 день	2 день	3 день		1 день	2 день	3 день				
	0,5	0,5132	0,5088		0,4795	0,5005	0,0127				
1,0	0,9771	0,9792	0,9844	0,9802	0,0031	-0,001	-0,0042	0,0023	0,0073	0,0076	
2,0	2,0225	2,0232	1,9967	2,0141	0,0084	0,0091	-0,0174	0,0087	0,0265	0,0287	

ВИСНОВКИ

Розроблено чутливу специфічну методику призначену для вивчення фармакокінетики ветеринарних препаратів на основі активної діючої речовини – цефквіному сульфату. Розроблена методика лінійна в діапазоні концентрацій 0,1 – 4,0 мкг/мл плазми крові тварини.

Перспективи досліджень. Генеричні ветеринарні препарати на основі цефквіному сульфату, які вироблятимуться в нашій країні, потребуватимуть для реєстрації клінічних досліджень на тваринах і, відповідно, застосування розробленої методики.

References

COMMISSION DECISION of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044) text with EEA relevance 2002/657/EC // Official Journal of the European Union. – 17.08.2002. – L221. 8.

Ishchenko, M.P. & Kanivets, N.S. (2021). Tsefalosporyny na suchasnomu rynku veterynarnykh preparativ Ukrainy. Materialy V Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi internet-konferentsii «Suchasni aspekty likuvannya i profilaktyky khvorob tvaryn», 20-21.10.2021. Poltava, Ukraina. S. 68-70 [in Ukrainian].

Kami, Uney, Feray, Altan, Muammer, Elmas (2011). Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Cefquinom Concentrations in Sheep Plasma and its Application to Pharmacokinetic Studies. *Antimicrob Agents Chemothe.* 55(2). 854-859. doi: 10.1128/AAC.01126-10.

Limbert, M., Isert, D., Kleser, N., Marhus, A., Seeger, K., Seibert, G. et al. (1991). Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V) a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 35(1).14-19. DOI: 10.1128/AAC.35.1.14.

Mahnusona, B. & Ernemark, U. (2016). Prydatnist analitychnykh metodiv dlia konkretnoho zastosuvannya. Nastanova dlia laboratorii z validatsii metodiv ta sumizhnykh pytan. Kyiv, TOV «Iurka Liubchenka», 92 [in Ukrainian] Electronic resource. Access mode: https://www.eurachem.Org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_UA.pdf

X B Li, W X Wu, D Su (2009). Pharmacokinetics and bioavailability of cequinome in healthy piglets. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 31(6). 523-527. DOI: [10.1111/j.1365-2885.2008.00989.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00989.x)