

Validarea unei metode HPLC de determinare a atenololului în plasma umană

LAURIAN VLASE¹, SORIN LEUCUȚA¹, SILVIA IMRE²

¹ Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Farmacie, Cluj-Napoca, Str. Victor Babeș, Nr. 41, 400012, Cluj, România

² Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș, Facultatea de Farmacie, Str. Gheorghe Marinescu, Nr. 38, 540139, Târgu-Mureș, România

An HPLC method with fluorescence detection for atenolol determination in human plasma was developed and validated, using metoclopramide as internal standard. After protein precipitation with perchloric acid, atenolol was separated at 30 °C on a C18 column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μm. The mobile phases consisted of a mixture of acetonitrile:sodium dihydrogen phosphate 40 mM, pH 3 with phosphoric acid 85%, 10:90 (solvent A), and acetonitrile (solvent B). The elution was made in gradient mode: 0-4 min 0%B, 4-8 min 30% B, 8-13 min 0%B, at 1 ml/min. The excitation and emission wavelengths were Ex/Em = 235/315 nm for 7.5 min, and 309/356 until 13 min. The method was linear between 10-1000 ng/ml, with an accuracy and precision of -8.6-+6.3 %, being between -18.7% and 9.8% at lower limit of quantification. The method was applied for atenolol determination in human plasma after oral administration of 100 mg atenolol.

Keywords: atenolol, HPLC, plasma, metoclopramide

Atenololul este un beta-blocant selectiv fără activitate intrinsecă, utilizat în tratamentul hipertensiunii, anginei pectorale sau a aritmiilor cardiace. După administrarea orală, absorbția este redusă datorită caracterului său hidrofil, numai 50% din doză fiind biodisponibilă. După o doză orală de 100 mg, maximul concentrației plasmatice este atins la 3 ore și este, în medie, de 0,5 μg/mL. Există variații mari în ceea ce privește mărimea picului plasmatic al atenololului datorită diferențelor în metabolizare [1,18].

Dezvoltarea unei metode de determinare a concentrației plasmatice a unei substanțe medicamentoase în scopul aplicării acesteia în studii de farmacocinetică și bioechivalență trebuie să țină cont de câteva aspecte. Metoda trebuie să demonstreze, pe lângă acuratețe și precizie pe domeniul de concentrații investigat, specificitate, în raport cu compușii endogeni plasmatici și cei de metabolizare, și suficientă sensibilitate, așa încât să permită cuantificarea analitului după cel puțin patru timpi de înjumătățire pentru a se putea realiza analiza farmacocinetică [23-24]. Nu trebuie neglijat nici faptul că aceste studii implică analiza a sute sau mii de probe și, în consecință, este de preferat o metodă rapidă și economică de prelucrare a probelor și, pe cât posibil, un timp scurt de analiză instrumentală.

Ținând cont de aceste aspecte, în lucrare este prezentată o nouă metodă HPLC de determinare cantitativă a atenololului în plasma umană, aplicând un procedeu

simplic și economic de prelucrare a probelor bazat pe precipitarea proteinelor și folosind ca standard intern metoclopramidă (fig. 1).

Partea experimentală

Materiale de lucru

S-au utilizat atenolol și metoclopramidă clorhidrat, standarde de lucru oferite de SC Terapia S.A., România. Acetonitrilul, metanolul, fosfatul diacid de sodiu, acid fosforic 85%, acid percloric 70% au fost de calitate Merck KgaA (Darmstadt, Germania). Apa deionizată a fost obținută cu ajutorul sistemului de purificare a apei Direct Q5 (Millipore SA, Molsheim, Franța).

Condiții cromatografice

Cromatograful utilizat a fost tipul 1100 Series (Agilent Technologies, SUA), fiind compus dintr-o pompă binară, injector automat, termostat, fixat la 30°C și detector de fluorescență (lungimile de undă de excitație și emisie Ex/Em = 235/315 nm până la 7,5 min, 309/356 până la 13 min). Separarea s-a realizat pe o coloană cromatografică de tipul Zorbax SB-C18, 150 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm (Agilent). Faza mobilă a fost formată dintr-un amestec A ce conține acetonitril:fosfat diacid de sodiu 40 mM, adus la pH 3 cu H₃PO₄ 85%, în raport volumetric 10:90, și solventul B acetonitril. Eluția s-a făcut în gradient de compoziție: 0-4 min 0%B, 4-8 min 30% B, 8-13 min 0%B. Debitul fazei mobile a fost 1 mL/min. Înainte de analiză, faza mobilă a fost degazată pentru 10 min în baia de ultrasunete Elma Transsonic 700/H (Singen, Germania). Volumul de injecție a fost 100 μL.

Soluții standard

Soluțiile stoc de atenolol și metoclopramidă (1 mg/mL) au fost obținute prin dizolvarea substanțelor în metanol și păstrate la 4°C, fiind stabile cel puțin 3 luni în aceste condiții. Soluțiile standard de lucru de atenolol și metoclopramidă au fost obținute prin diluarea corespunzătoare a soluțiilor

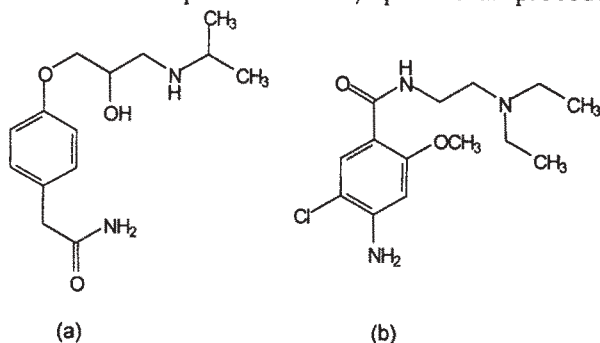


Fig. 1. Structurile chimice ale (a) atenololului și (b) metoclopramidei

* email silsta@yahoo.com

stoc cu apă distilată, fiind utilizate la marcarea a 0,5 mL plasmă pentru a obține concentrații plasmatice pe domeniul 10-1000 ng/mL atenolol și 500 ng/mL metoclopramidă.

Prelucrarea probelor

Într-un tub de centrifugă de 2 mL s-au introdus: 0,5 mL plasmă, 100 μ L apă distilată și 100 μ L soluție standard intern (2,5 μ g/mL). Tubul a fost agitat 10 s la vortex-mixer (Genie 2, Scientific Industries Inc., SUA). S-au adăugat 200 μ L soluție acid percloric 7%. După agitare, tubul a fost centrifugat la 6000 rpm timp de 4 min. 200 μ L din supernatant s-au adus într-un flacon de injecție.

Validarea metodei analitice

Orice metodă analitică, în particular o metodă bioanalitică, pentru a fi validată trebuie să demonstreze în primul rând că este specifică în raport cu substanțele endogene existente în matricea biologică, cu producții de metabolizare și reactivii utilizați la pregătirea probei [23-24]. În acest sens s-a verificat specificitatea metodei folosind șase plasmă blanc din surse diferite, urmărindu-se dacă există interferențe plasmatice endogene la timpii de retenție ai analiților studiați. De asemenea, s-au analizat șase probe de plasmă umană recoltate la diferiți timpi după administrarea orală a 100 mg atenolol.

Linearitatea metodei s-a verificat prin metoda celor mai mici pătrate, pe domeniul 10-1000 ng/mL atenolol, alegând calibrarea cu standard intern ca model de calibrare. Raportul dintre aria atenololului și aria metoclopramidului a fost calculat pentru șapte nivele de concentrație plasmatice ale atenololului în domeniul ales și utilizat pentru construirea curbelor de calibrare. S-a investigat distribuția rezidualilor, deviația relativă procentuală a concentrației recalculate din ecuația curbei de calibrare față de concentrația realizată, pentru fiecare punct de calibrare. Modelul de calibrare a fost considerat corect ales dacă rezidualii s-au încadrat între limitele $\pm 20\%$ la limita inferioară de calibrare și $\pm 15\%$ la celelalte concentrații și nu au avut o tendință continuă de creștere sau scădere cu concentrația. Corelația s-a apreciat liniară la o valoare a coeficientului de determinare mai mare de 0,99.

Acuratețea, exprimată ca deviația relativă procentuală a concentrației măsurate față de concentrația realizată, și precizia metodei, exprimată prin deviația standard relativă procentuală sau coeficientul de variație CV%, s-au determinat la trei nivele de concentrație, 50,2, 251,1 și,

respectiv, 803,5 ng/mL, aflate în domeniul de concentrații ales. Au fost determinate precizia și acuratețea în aceeași zi de determinare, pe baza a cinci măsurători pe cinci probe diferite la fiecare concentrație, și acuratețea și precizia în zile diferite pe baza analizei în zile diferite a câte cinci probe standard la fiecare din cele trei nivele de concentrație alese.

Limita de cuantificare inferioară s-a apreciat ca cea mai mică concentrație de pe dreapta de calibrare cu o acuratețe și precizie în limitele $\pm 20\%$.

Regăsirea a fost apreciată la patru nivele de concentrație, inclusiv la limita inferioară de cuantificare, prin compararea răspunsului atenololului obținut după precipitarea proteinelor cu cel obținut cu o soluție standard de aceeași concentrație în apă și prelucrată în același mod ca probele biologice.

Aplicație clinică

Metoda cromatografică validată a fost aplicată într-un studiu de bioechivalență a două produse farmaceutice care conțin 100 mg atenolol. Timpii de recoltare a probelor biologice au fost 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 ore după administrarea dozei. După centrifugarea sângelui, plasma separată a fost separată și înghețată sub -20°C până la prelucrare. În timpul analizei probelor biologice provenite de la voluntari, s-a verificat validitatea metodei incluzând în fiecare serie de analiză un număr de probe standard de control în duplicat la trei nivele de concentrație (50,2; 251,1 și, respectiv, 803,5 ng/mL). Seriele de analiză s-au considerat valide dacă patru din șase probe standard de control au avut concentrațiile în limitele $\pm 15\%$ din valoarea nominală. Două din șase probe standard de control, dar nu la aceeași concentrație, pot avea concentrațiile în afara acestor limite.

Rezultate și discuții

Lungimile de undă de lucru au fost stabilite la valorile Ex/Em 235/315 nm pentru atenolol și 309/356 nm pentru metoclopramidă, ținând cont de diferențele spectrale dintre cele două substanțe și urmărind obținerea unui maxim de selectivitate și sensibilitate (fig. 2).

Așa cum se observă din figura 3, în condițiile cromatografice propuse nu există interferențe la timpii de retenție ai analiților, atenololul și metoclopramida fiind separați de compușii endogeni în 13,5 min de analiză.

Metoda prezintă un răspuns liniar pe domeniul 10 - 1000 ng/mL, cu un coeficient mediu de determinare $R^2 > 0,999$.

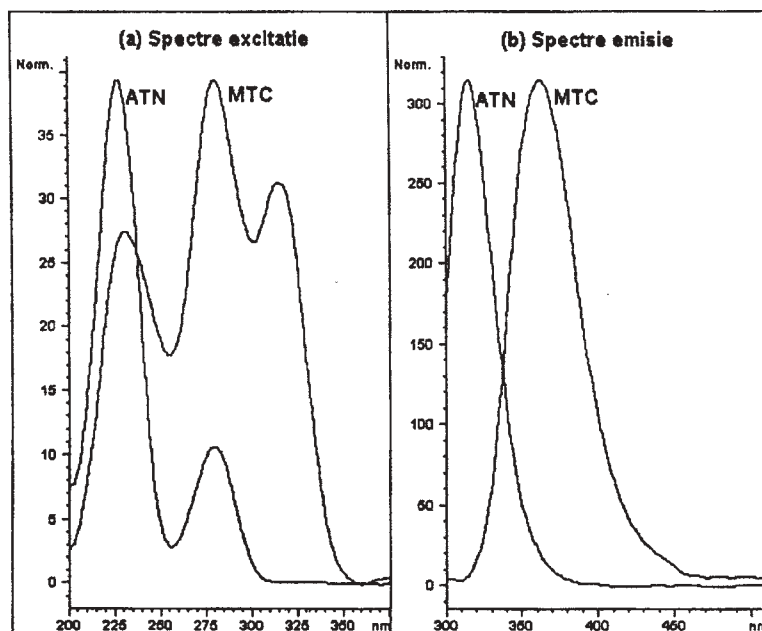


Fig. 2 Spectrele de excitație (a) și emisie (b) ale atenololului ATN și metoclopramidei MTC

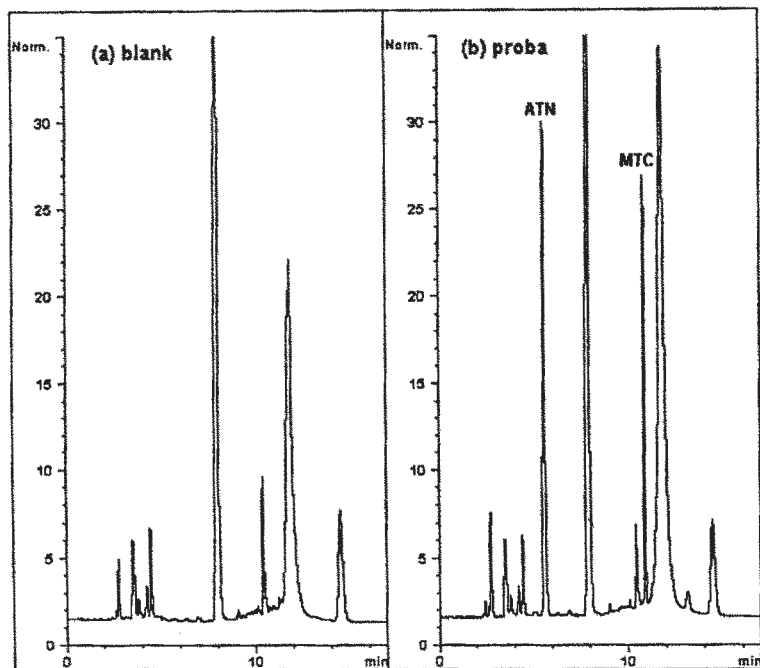


Fig. 3 Cromatogramele pentru (a) un blank de plasmă și (b) o probă plasmatică cu atenolol ATN și metoclopramidă MTC (250 ng/mL atenolol, 500 ng/mL metoclopramidă)

Distribuția rezidualilor a fost întâmplătoare, încadrându-se între limitele -8,7% și 7,1%, la limita inferioară de cuantificare aceștia fiind între limitele $\pm 20\%$. Modelul de calibrare a fost acceptat.

Acuratețea și precizia determinărilor efectuate în aceeași zi (tabelul 1) și în zile diferite (tabelul 2) sunt mai mici decât valorile admise în astfel de determinări ($\pm 20\%$ la limita de cuantificare, respectiv, $\pm 15\%$ la celelalte concentrații). Limita de cuantificare a fost stabilită la 10 ng/mL atenolol, cu o acuratețe și precizie în limitele admise de $\pm 20\%$.

În condițiile propuse, regăsirea atenololului s-a încadrat între limitele 101-116%.

În ceea ce privește analiza probelor biologice, toate seriile de analiză au fost validate, cel mult două din șase probe standard de control au fost în afara limitelor admise, dar nu ambele la aceeași concentrație. În figura 4 este prezentată curba de variație concentrație - timp la un voluntar sănătos, după administrarea orală a unei doze orale unice de 100 mg atenolol.

Tabelul 1
ACURATEȚEA, PRECIZIA ȘI REGĂSIREA ÎN ACEEAȘI ZI (n = 5)

Concentrația realizată, ng/ml	Concentrația măsurată, ng/ml \pm DS	Precizie (C.V. %)	Acuratețe, %	Regăsire, % \pm DS
10.0	8.2 \pm 0.8	9.8	-18.7	109.9 \pm 4.7
50.2	47.4 \pm 1.5	3.2	-5.6	116.3 \pm 1.3
251.1	266.9 \pm 6.8	2.5	6.3	106.9 \pm 1.2
803.5	806.2 \pm 8.4	1.1	0.3	104.2 \pm 1.6

Tabelul 2
ACURATEȚEA, PRECIZIA ȘI REGĂSIREA ÎNTRE ZILE DIFERITE (n = 5)

Concentrație realizată, ng/ml	Concentrație măsurată, ng/ml \pm DS	Precizie (C.V. %)	Acuratețe, %	Regăsire, % \pm DS
10.0	8.4 \pm 0.8	9.5	-16.0	110.2 \pm 3.5
50.2	45.9 \pm 0.8	1.7	-8.6	111.3 \pm 2.9
251.1	260.1 \pm 1.9	0.8	3.6	102.8 \pm 2.1
803.5	777.6 \pm 30.9	3.9	-3.2	101.2 \pm 3.8

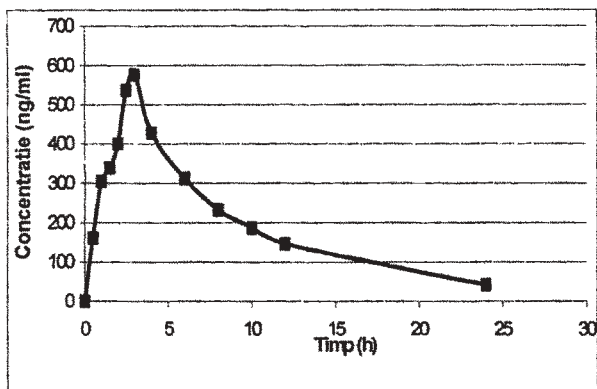


Fig. 4. Concentrațiile plasmatice ale atenololului la un voluntar după administrarea pe cale orală a unei doze unice de 100 mg atenolol

în jur de 10 ng/ml, mai bună decât în celelalte cazuri în care s-a utilizat extracția în fază solidă [1,8-10,21]. Deși metodele bazate pe injectare directă de plasmă, extracție și concentrare automată în fază solidă, au demonstrat o sensibilitate bună [6,16-17,19-20], necesită completarea sistemului cromatografic cu un dispozitiv special de extracție.

Metoda propusă în această lucrare se bazează pe analiza atenololului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cu detecție de fluorescență, după precipitarea simplă a proteinelor cu acid percloric. Prin alegerea judicioasă a lungimilor de undă de excitație și emisie s-a putut realiza o analiză specifică și sensibilă a atenololului, cu o limită de cuantificare de 10 ng/mL, comparabilă cu cea prezentată în majoritatea metodelor citate, iar timpul

Tabelul 3
CARACTERISTICI ALE UNOR METODE DE CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ APLICATE LA DETERMINAREA ATENOLULUI ÎN SÂNGE, SER SAU PLASMĂ, PUBLICATE ÎN LITERATURA DE SPECIALITATE

Autori, anul publicației	Coloană	Detecție, nm	Mediul biologic, extracție	LIC	t _R , min	SI	Ref. bibl.
Verchese C. și col., 1983	CN	224	Plasmă, EFS	25 ng/ml	6	Practolol	2
Miller L.G. și col., 1986	C18	Ex280/Em300	Plasmă, LL	5 ng/ml	4,2	Metoprolol	3
Rossee M.T. și col., 1991	C18	Ex227/Em310	Plasmă, LL	10 ng/ml	5,9(S), 6,5(R)	Practolol	4
Miller L.G. și col., 1992	C18	Ex230/Em305	Sânge, LL	12,5 ng/ml	9,8(S), 11,0(R)	Metoxamină	5
He J. și col., 1993	C18, Chirală	?	Plasmă, ID	10 ng/ml	?	?	6
Egginger G. și col., 1993	Chirală	Fuorescență	Plasmă, LL	0,5 ng (R), 0,6 ng (S)	?	?	7
Phelps S.J. și col., 1995	C8	220 nm	Ser, EFS	50 ng/ml	10	Practolol	8
Chatterjee D. și col., 1995	C18	Ex228/Em310	Ser, EFS	50 ng/ml	10,4	Albuterol	9
Lukkari P. și col., 1995	C8	260 nm	Ser, EFS	?	2,5	?	10
Irshaid Y.M. și col., 1996	RP - Select B	Ex222/Em300	Plasmă, LL	50 ng/ml	2,8	Bametan	11
Martins M.L. și col., 1997	C18	Ex240/Em300	Plasmă, LL	20 ng/ml	5,5	Metoprolol	12
Giachetti C. și col., 1997	C18	Ex222/Em300	Plasmă, LL	10 ng/ml	15,7	Salbutamol	13
Gaillard Y. și col., 1997	C8	200.5 nm	Sânge, LL	?	3,6	?	14
Chiu F.C.K. și col., 1997	?	Fluorescență	Plasmă, -	2 ng/ml	?	Hidroxi-metoprolol	15
Hermansson J. și col., 1998	C18	Ex230/Em300	Plasmă, ID	?	9,5	?	16
Chiap P. și col., 1999, 2000	C8	225 nm	Plasmă, ID	25 ng/ml	?	Sotalol	17,19
Niopas I. și col., 2000	CN	Ex229/Em309	Plasmă, LL	10 ng/ml	?	Procainamidă	18
Mislanova C. și col., 2001	C18	280 nm	Plasmă, ID	10 ng/ml	?	?	20
Iha M.H. și col., 2002	Chirală	?	Plasmă, LL, EFS	10 ng/ml	?	?	21
Delamoye M. și col., 2004	C18	220 nm	Plasmă, LL	25 ng/ml	?	?	22

LIC – limita inferioară de cuantificare; EFS – extracție în fază solidă; LL – extracție lichid-lichid; ID – injectare directă cu separare automată în fază solidă; Ex/Em – lungimi de undă de excitație și emisie; SI – standard intern; ? – informație indisponibilă.

Numărul de articole științifice referitoare la determinarea cantitativă a atenololului în plasmă, sânge sau ser, prin cromatografie de lichide de înaltă performanță este mare. Studiind articolele prezentate succint în tabelul 3, se poate constata că majoritatea metodelor propuse se bazează pe extracția lichid-lichid a atenololului din probele biologice [3-5,7,11-14,18,21-22], o metodă consumatoare de solvenți și timp, dar cu o limită inferioară de cuantificare

de analiză stabilit asigură eluția tuturor interferențelor plasmatice. De fapt, într-o singură lucrare dintre cele studiate este descrisă o limită inferioară de cuantificare mai bună [3].

Concluzii

A fost optimizată și validată o metodă HPLC cu detecție fluorimetrică pentru cuantificarea atenololului în plasma umană. Deși această metodă are o sensibilitate

comparabilă cu cea raportată în alte lucrări, avantajul acesteia îl constituie faptul că modul de prelucrare a probelor de plasma este foarte simplu, bazându-se pe simpla precipitare a proteinelor. Ținând cont de lucrările științifice studiate, acest mod de prelucrare a probelor plasmatică de atenolol nu a mai fost descris până acum și, în condițiile cromatografice propuse, prezintă cel puțin aceeași sensibilitate ca metodele descrise în literatură bazate pe extracție lichid-lichid sau extracție în fază solidă. Metoda și-a demonstrat validitatea în timpul analizei probelor de plasmă obținute în cadrul unui studiu de bioechivalență.

Bibliografie

- 1.*** Physicians' Desk Reference, 47th edition, Medical Economics Data, 1993, p. 1129
- 2.VERGHESE, C., MCLEOD, A., SHAND, D., J. Chromatogr., **275**, 1983, p. 367
- 3.MILLER, L.G., GREENBLATT, D.J., J. Chromatogr. B, **381**, 1986, p. 201.
- 4.ROSSEEL, M.T., VERMEULEN, A.M., BELPAIRE, F.M., J. Chromatogr., **568**, 1991, p. 239
- 5.MILLER, R.B., GUERTIN, Y., J. Liq. Chromatogr., **15**, 1992, p. 1289
- 6.HE, J., SHIBUKAWA, A., NAGAKAWA, T., WADA, H., FUJIMA, H., IMAI, E., GO-OH, Y., Chem. Pharm. Bull., **41**, nr. 3, 1993, p. 544
- 7.EGGINGER, G., LINDNER, W., KAHR, S., STOSCHITZKY, K., Chirality, **5**, nr. 7, 1993, p. 505
- 8.PHELPS, S.J., ALPERT, B.S., WARD, J.L., PIEPER, J.A., LIMA, J.J., J. Clin. Pharmacol., **35**, 1995, p. 268
- 9.CHATTERJEE, D.J., LI, W.Y., HURST, A.K., KODA, R.T., J. Liq. Chromatogr., **18**, 1995, p.791

- 10.LUKKARI, P., SIREN, H., J. Chromatogr. A, **717**, 1995, p. 211
- 11.IRSHAD, Y.M., RAWASHDEH, N.M., AWWADI, F.F., KATO, M.K., Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., **30**, nr. 10, 1996, p. 457
- 12.MARTINS, M.L., PIEROSI, M.A., MORAES, L.A., RIBEIRO, W., ABBIB, E.JR., MENDES, G.B., POLI, A., DE NUCCI, G., MUSCARA, M.N., Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., **35**, nr. 8, 1997, p. 324
- 13.GIACHETTI, C., TENCONI, A., CANALI, S., ZANOLO, G., J. Chromatogr. B, **698**, 1997, p. 187
- 14.GAILLARD, Y., PEPIN, G., J. Chromatogr. A, **763**, 1997, p. 149
- 15.CHIU, F.C.K., ZHANG, J.N., LI, R.C., RAYMOND, K., J. Chromatogr. B, **691**, 1997, p. 473
- 16.HERMANSSON, J., GRAHN, A., HERMANSSON, I., J. Chromatogr. A, **797**, 1998, p. 251
- 17.CHIAP, P., HUBERT, PH., BOULANGER, B., CROMMEN, J., Anal. Chim. Acta, **391**, 1999, p. 227
- 18.NIOPAS, I., DAFTSIOS, A.C., XANTHAKIS, I., NIKOLAIDIS, N., NJAU, S.N., Arzneim.-Forsch./Drug Res., **50 (I)**, nr. 3, 2000, p. 243
- 19.CHIAP, P., MIRALLES BURAGLIA, B., CECCATO, A., HUBERT, PH., CROMMEN, J., J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., **739**, 2000, p. 205
- 20.MISLANOVA, C., HUTTA, M., J. Chromatogr. B, **765**, 2001, p. 167
- 21.IHA, M.H., MARTINEZ, A.S., BONATO, P.S., J. Chromatogr. B, **767**, 2002, p. 1
- 22.DELAMOYE, M., DUVERNEUIL, C., PARAIRE, F., DE MAZANCOURT, P., ALVAREZ, J.C., Forensic Sci. Int., **141**, nr. 1, 2004, p. 23
- 23.*** U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, May 2001
- 24.*** The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence, 26 July 2001

Intrat în redacție: 9.07.2006