

Е. В. Хлыбова, Е. С. Кормищикова, А. В. Дробкова, И. В. Парамонов

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАПРИЛАТА НАТРИЯ В ПРЕПАРАТЕ “АЛЬБУМИН, РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ”

ФГБУН “Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России”, Россия, 610027, Киров, Красноармейская ул., д. 72; e-mail: niigpk@yandex.ru

Предложена методика количественного определения содержания каприлата натрия с применением гель-проникающей ВЭЖХ и регистрацией сигнала рефрактометрическим детектором. В валидационных испытаниях доказана пригодность методики. Включение в хроматографическую систему спектрофотометра позволяет проводить контроль 2 показателей (“Натрия каприлат” и “Полимеры и агрегаты”) в одной постановке.

Ключевые слова: альбумин человека; плазма крови; натрия каприлат; гель-проникающая ВЭЖХ.

В производстве белковых препаратов плазмы крови человека, в частности, препаратов альбумина (АЛ), в качестве фракционирующего агента и стабилизатора широко используют каприлат натрия (КН) [1, 2]. Однако известно, что натриевая соль каприловой кислоты токсична и аллергенна. Введение значительных доз КН с раствором АЛ в кровяное русло человека может сопровождаться развитием гипогликемии, подавлением реактивности тромбоцитов, увеличением продукции инсулина и ряда ферментов, а также некоторыми другими осложнениями [1]. Имеются сведения о цитотоксическом действии КН [3]. Кроме того, согласно отечественной практике и международным требованиям, содержание всех используемых в процессе производства и вносимых в препарат веществ должно оцениваться в рамках выходного контроля качества лекарственного средства, а метод определения должен быть описан в нормативной документации. Все это диктует необходимость разработки специфичного, чувствительного и воспроизводимого метода определения концентрации КН в препаратах АЛ.

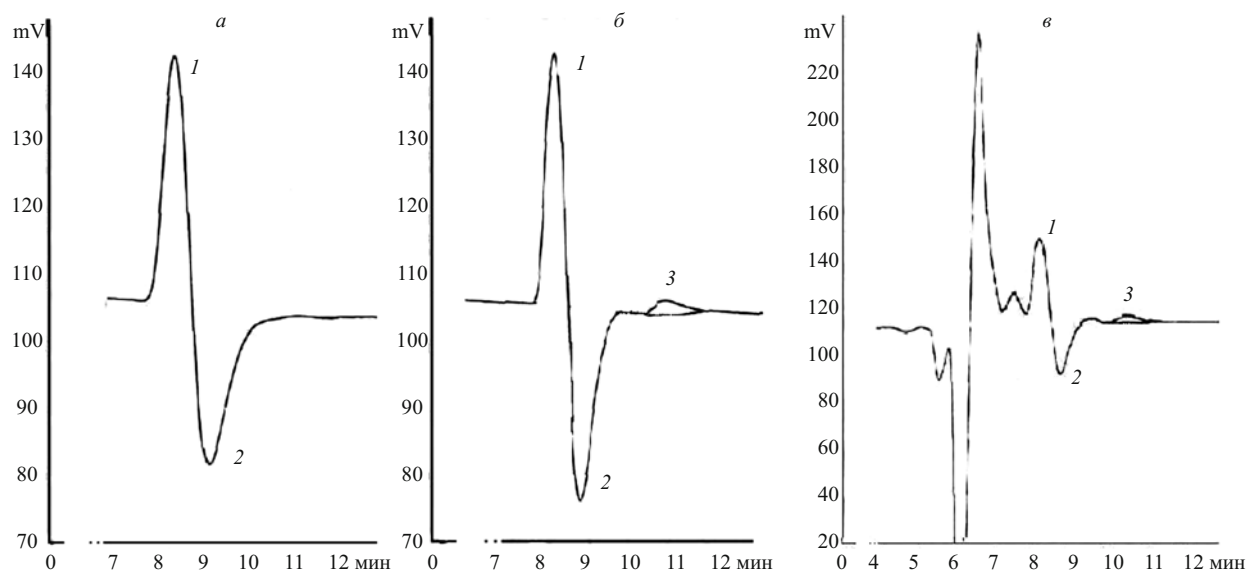
На сегодняшний день общепринятой методики контроля показателя “Натрия каприлат” в белковых препаратах плазмы нет. Российская фармакопейная статья (ФС) “Альбумин человека” содержит лишь ссылку на общую ФС “Высокоэффективная жидкостная хроматография”. Европейская фармакопея не требует проведения контроля по этому параметру. Известна методика [4], предусматривающая использование ион-экслюзионной хроматографии на колонке Aminex A5, при этом элюцию проводят раствором серной кислоты, вызывающей гидролиз белков, время анализа составляет более 40 мин, при этом требуется регенерация сорбента. Вместе с тем обязательным для контроля показателем качества препаратов АЛ является относительное содержание полимеров и агрегатов основного белкового компонента. Определение проводят методом гель-проникающей ВЭЖХ с регистрацией сигнала спектрофотометрическим детектором. Этот вариант ВЭЖХ не требует использования агрессивных веществ в подвижной фазе, таких как минеральные кислоты; компоненты анализируемой пробы имеют

Таблица 1

Валидационные характеристики и критерии приемлемости

Валидационная характеристика	Критерий приемлемости
Специфичность	В образце плацебо КН должен отсутствовать, в остальных — выявляться.
Линейность	Коэффициент корреляции R между показателями концентрации растворов и результатом хроматографического определения должен быть более 0,99.
Правильность	Номинальные значения концентрации КН должны лежать в пределах доверительного интервала средних значений, полученных экспериментально. То есть систематическая погрешность не должна превышать величины полуширины доверительного интервала среднего. $C_{cp} - S_c t_{табл} \leq C_{ном} \leq C_{cp} + S_c t_{табл}$ или $ C_{ном} - C_{cp} \leq S_c t_{табл}$.
Сходимость	Коэффициент вариации RSD результатов, полученных одним аналитиком для одного образца, не должен превышать 10 %.
Внутрилабораторная прецизионность	Коэффициент вариации RSD _{общ} результатов, полученных двумя аналитиками для одного образца, не должен превышать 10 %. Различия результатов, полученных двумя сотрудниками для одного образца, не должны быть статистически значимы: $t_{расч} < t_{табл}$.

Здесь и в табл. 2: R — коэффициент корреляции, C_{cp} — среднее значение концентрации КН в пробе, $C_{ном}$ — номинальная концентрация КН в пробе, S_c — стандартное отклонение среднего результата, RSD — относительное стандартное отклонение, % (коэффициент вариации), RSD_{общ} — относительное стандартное отклонение по результатам, полученным двумя аналитиками, %, $t_{расч}$ — расчетное значение критерия Стьюдента, $t_{табл}$ — табличное значение критерия Стьюдента для соответствующего числа степеней свободы при уровне значимости 0,05.



Профили элюции воды очищенной (а), раствора КН 3 г/л (б) и препарата “Альбумин, раствор для инфузий 10 %” (е) на колонке Zorbax GF-250, рефрактометрическая детекция. По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — результат оценки рефракции, mV.

короткий промежуток времени прохождения через колонку; срок эксплуатации колонки более длительный по сравнению с ионообменными сорбентами. Совмещение 2 анализов (“Натрия каприлат” и “Полимеры и агрегаты”) в одной постановке на одной хроматографической системе позволило бы упростить и удешевить процедуру контроля качества препаратов АЛ.

Целью настоящего исследования явилась разработка и метрологическая оценка методики количественного определения КН в препарате “Альбумин, раствор для инфузий” с использованием гель-проникающей ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Хроматографирование проводили в условиях, соответствующих анализу содержания полимеров и агрегатов в АЛ, с регистрацией сигнала рефрактометрическим детектором. В состав системы входили: насос

“Maraphon I” (“Rigas Labs”, Греция), демпфер “Элсидемп 4” (“Элсико”, Россия), инжектор “Reodyne 7125” (“EcomSpol”, Чехия), рефрактометр “R 401” (“Waters”, США). Разделение проводили на специализированной для биополимеров колонке типа Zorbax GF-250 (Agilent, США) размером 9,4 × 250 мм. Подвижная фаза — 0,5 М фосфатный буферный раствор (БР), pH 7,0, с добавлением хлорида натрия в концентрации 2,45 %. Дегазацию осуществляли нагреванием или вакуумированием. Ввод образцов проводили с помощью шприца Гамильтона, инъекционный объем составлял 20 мкл, скорость потока — 1,5 мл/мин, время анализа — 12 мин. Результаты регистрировали и обрабатывали с помощью программно-аппаратного комплекса “Мультихром 1.5” (“Амперсенд”, Россия). До проведения анализа хроматографическую колонку уравнивали, пропуская через нее 5 – 10 объемов БР до получения на регистраторе прямой базовой линии, параллельной оси абсцисс.

Таблица 2

Статистические характеристики результатов хроматографии исследуемых растворов

Статистическая характеристика	Стандартные растворы КН						Альбумин, раствор для инфузий 10 %	
	1,5 г/л		3 г/л		6 г/л		A1	A2
	A1	A2	A1	A2	A1	A2		
Среднее арифметическое, C_{cp}	1,495	1,492	3,003	2,985	6,002	5,992	2,944	2,921
Стандартное отклонение, S	0,015	0,022	0,061	0,053	0,064	0,044	0,052	0,057
Стандартное отклонение среднего, S_c	0,006	0,009	0,025	0,022	0,026	0,018	0,021	0,023
Систематическая погрешность, $ C_{ном} - C_{cp} $	0,005	0,008	0,003	0,014	0,002	0,009	-	-
Полуширина доверительного интервала среднего, $S_c t_{табл}$	0,015	0,023	0,064	0,057	0,067	0,046	0,054	0,059
Коэффициент вариации, RSD	1,003	1,475	2,031	1,776	1,066	0,734	1,766	1,951
Коэффициент вариации результатов двух аналитиков, $RSD_{общ}$	1,207		1,854		0,879		1,821	
Коэффициент Стьюдента $t_{расч}$	0,276		0,518		0,326		0,736	

На этапе оценки возможности использования указанной хроматографической системы исследовали образцы препарата “Альбумин, раствор для инфузий 5, 10, 20 %”, полуфабрикат альбумина, не содержащий стабилизатор, и водные растворы КН 1,5; 3,0 и 6,0 г/л. Для приготовления последних точную навеску 3,00 г натрия каприлата, высушенного до постоянной массы при температуре 60 °С, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в небольшом количестве воды очищенной и доводили объем раствора до метки. Затем в ряд мерных колб вместимостью 25 мл вносили 1,25; 2,5 или 5 мл приготовленного раствора соответственно и доводили объемы растворов до метки водой очищенной. Для оценки влияния растворителя проводили анализ воды очищенной.

На рисунке представлены типичные профили элюции растворителя (*а*), раствора КН (*б*) и препарата АЛ (*в*). Хроматографический профиль водных растворов КН характеризовался наличием 3 пиков со временем удерживания 8,2 мин (пик 1); 8,9 мин (“отрицательный” пик 2) и 10,4 мин (пик 3) соответственно. Пики 1 и 2 также выявлялись на хроматограммах растворителя. Это позволило предположить, что со временем удерживания 10,4 мин из колонки элюируется фракция, содержащая КН. Для проверки этого предположения провели последовательную хроматографию растворов КН с концентрацией 1,5; 3 и 6 г/л и оценили взаимосвязь площади пика 3 и концентрации раствора. Полученное значение коэффициента корреляции Пирсона *R* составило 0,972, что свидетельствовало о наличии тесной прямой линейной зависимости в исследуемом диапазоне значений.

Результаты и их обсуждение

На хроматограммах образцов препаратов АЛ выявлялись 7 пиков, в том числе с временами удерживания 8,2; 8,9 и 10,4 мин, в то же время в полуфабрикате АЛ без добавления стабилизатора фракции, соответствующей КН, выявлено не было. Полученные данные свидетельствовали о возможности количественного определения КН методом гель-проникающей хроматографии. Эффективность используемой колонки по пику каприлат-иона составляла не менее 1200 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии — не более 1,4. Результаты хроматографии растворов КН с известной концентрацией были использованы для градуировки хроматографической системы и создания протокола анализа. Среднее квадратичное отклонение повторных результатов хроматографии растворов КН при градуировании составило 3,48 %.

С целью определения метрологических характеристик разработанная методика была подвергнута валидационным испытаниям, в ходе которых оценивали ее специфичность, линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторную прецизионность. Критерии приемлемости устанавливали в соответствии с рекомендациями по валидации аналитических методик и сведениями литературных источников (табл. 1) [5 – 7].

Расчет статистических показателей проводили по общепринятым формулам [7, 8].

Образцами для испытаний явились водные растворы КН 1,5; 3,0 и 6,0 г/л (в качестве стандартных растворов с известным содержанием КН, серия препарата “Альбумин, раствор для инфузий 10 %”, раствор натрия хлорида 0,9 % (в качестве образца, не содержащего КН, плацебо)). Каждый образец подвергался шестикратной хроматографии двумя аналитиками (А1 и А2). Полученные данные обрабатывали с использованием электронных таблиц Microsoft Excel.

Специфичность метода оценивали по результатам хроматографии стандартных растворов, плацебо и раствора АЛ. Профиль элюции образца плацебо был идентичен таковому растворителя, пик 3 не идентифицировался; в то же время на хроматограммах АЛ и стандартных растворов фракция со временем удерживания 10,4 мин была выявлена. Следовательно, методика удовлетворяет установленному критерию специфичности.

Оценку линейности зависимости аналитического сигнала от содержания КН проводили на 3 уровнях концентрации. Рассчитывали коэффициент корреляции *R* номинального значения концентрации КН в стандартных растворах и результата определения площади пика 3. Расчетное значение *R* составило 0,9999. Таким образом, линейность методики в исследуемом диапазоне нашла свое подтверждение.

Результаты статистической обработки данных, полученных двумя аналитиками в ходе хроматографического определения содержания КН в исследуемых образцах, представлены в табл. 2. Номинальные значения концентрации КН лежат внутри доверительных интервалов средних результатов анализов, полученных экспериментально, при $t_{\text{табл}} = 2,571$ и уровне значимости 0,05. Показатели относительного стандартного отклонения варьировали в пределах $1,003 \div 2,031$ % для аналитика А1 и $0,734 \div 1,951$ % для аналитика А2. Максимальное значение составило 2,031 %, что не превышает максимально допустимого значения RSD. Следовательно, методика отвечает установленным требованиям правильности и сходимости.

Значения коэффициента вариации результатов определения концентрации КН двумя аналитиками в 6 повторностях варьировали для разных исследуемых образцов в пределах от 0,879 до 1,854 %. Различия результатов были статистически недостоверны, максимальное значение критерия Стьюдента $t_{\text{расч}}$ получено при анализе раствора альбумина и составило 0,736, что не превышало критического, равного 2,228 при числе степеней свободы 10 и уровне значимости 0,05. Следовательно, валидируемая методика отвечает критериям внутрилабораторной прецизионности.

Таким образом, разработана методика определения КН в растворе АЛ с использованием гель-проникающей ВЭЖХ. Она предусматривает применение колонки типа “Zorbax GF-250”, рефрактометрического детектора и 0,5 М фосфатного буферного раствора (рН 7,0) в качестве подвижной фазы. В ходе валидацион-

ных испытаний доказана приемлемость методики. Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности использования хроматографической системы, включающей рефрактометрический и спектрофотометрический детекторы, гель-фильтрационную колонку для определения 2 показателей качества препаратов АЛ человека: “Натрия каприлат” и “Полимеры и агрегаты”.

Методика внесена в Фармакопейную статью предприятия “Альбумин, раствор для инфузий 5, 10, 20 %”.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Г. Исрафилов, Э. Ю. Кудашева, Т. В. Кувшинова, Л. Г. Федько, *Гематол. и трансфузиол.*, **3**, 33 – 39 (2010).

2. M. Vargas, A. Segura, M. Herrera, et al., *Biotechnol. Progress*, **28**(4), 1005 – 1011 (2012).
3. Т. И. Глотова, А. Г. Глотов, О. В. Семенова, Н. В. Зубкова, *Международ. научно-исследов. ж.*, **7**(14), 87 – 89 (2013).
4. А. Н. Кузьменко, В. П. Панов, А. А. Иванов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **38**(5), 48 – 49 (2004); *Pharm. Chem. J.*, **38**(5), 277 – 278 (2004).
5. Н. В. Юргель, *Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств*, Москва (2007).
6. Н. А. Эпштейн, *Хим.-фарм. журн.*, **38**(4), 40 – 56 (2004); *Pharm. Chem. J.*, **38**(4), 212 – 228 (2004).
7. *XII Государственная фармакопея Российской Федерации*, часть 2, Москва (2010).
8. Стентон Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).

Поступила 12.12.14

CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF SODIUM CAPRYLATE IN HUMAN ALBUMIN SOLUTION

E. V. Khlybova*, E. S. Kormshchikova, A. V. Drobkova, and I. V. Paramonov

Kirov Research Institute of hematology and Blood Transfusion, Kirov, 610027 Russia

* e-mail: niigpk@yandex.ru

Sodium caprylate is used as a stabilizer and a fractionating agent in manufacturing human albumin solution (HAS) for infusion. Since HAS is transfused in large amounts and sodium caprylate is toxic, the concentration of sodium caprylate in the HAS must be reliably determined by specific, sensitive and reproducible method. In addition, the albumin quality control includes assessment of the content of “polymers and aggregates”. We propose a method for the quantitative determination of sodium caprylate by high performance gel-permeation liquid chromatography (HPGPC) with refractometric detection. Suitability of the methodology was proved by the validation procedure. Incorporation of a spectrophotometric detector in the chromatographic system allows the monitoring of both parameters (“sodium caprylate” and “polymers and aggregates”) in a single test.

Keywords: human albumin; blood plasma; sodium caprylate; high-performance gel-permeation liquid chromatography.