

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКОСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНРОФЛОКСАЦИНУ ТА ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ КУРЧАТ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З ФЛУОРОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

С. М. Мелікян, канд. біол. наук,
Н. В. Біронт, канд. біол. наук,
О. М. Паздерська, старший науковий співробітник,
Г. Л. Мисько, науковий співробітник,
М-М. В. Шимко, молодший 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
melikyansvetlana@gmail.com

Оскільки Україна є членом Світової організації торгівлі, це спричинило необхідність переходу всієї фармацевтичної галузі ветеринарних препаратів на європейський та світовий рівні та стандарти якості. Так, цього року було затверджено законопроект, в якому внесені зміни до процесу державної реєстрації ветеринарних препаратів у країні. Тому розроблений метод призначений для клінічних та фармацевтичних досліджень ветеринарних препаратів на основі активної речовини енрофлоксацину та його основного метаболіту – ципрофлоксацину. Досліджувані аналіти екстрагували із зразка дихлорметаном протягом 15 хв, концентрували висушуванням і знежирювали сумішшю гексан / тетрахлорид вуглець. Процедура підготовки збагачених зразків сироватки крові для побудови калібрувальних графіків описана в статті. Мобільна фаза за хроматографічного розділення складалася з ацетонітрилу та цитратного буфера. Градієнтний режим елюентів використовували протягом 16 хв за швидкості потоку 1,5 мл/хв. Час утримання піку ципрофлоксацину становить 8,8 хв, а час утримання піку енрофлоксацину - 10,45 хв. Розглянуто метрологічні характеристики методики відповідно до критеріїв Директиви Ради 2002/657/ЄС та Керівництва Eurachem. Специфічність аналітичної методики перевіряли за порівняння хроматографічного розділення зразка сироватки збагаченого розчином енрофлоксацину та ципрофлоксацину в концентрації 20 мкг/л та зразка сироватки плацебо. Метод є лінійним у діапазоні концентрацій 5,0 – 50,0 мкг/л кожного аналіту. Результати, отримані за дослідження лінійності цієї методики, використовувались для оцінки правильності та збіжності. Точність вимірювань оцінювали, досліджуючи відомі кількості аналітів, додані до контрольних зразків сироватки. Дані відновлення є прийнятними, оскільки вони знаходяться в межах $\pm 10\%$ від цільового значення. Методика характеризується достатньою збіжністю (точністю). Оцінку проміжної точності визначення енрофлоксацину та ципрофлоксацину оцінювали у три різні дні аналізу. Межа виявлення енрофлоксацину становить 0,05 мкг/л, а ципрофлоксацину - 0,02 мкг/л, що конкурує з раніше опублікованими методами ВЕРХ/ФЛД для визначення цих хінолонів. Основними перевагами розробленого методу є висока селективність та висока чутливість.

Ключові слова: БІОДОСТУПНІСТЬ, ЗБАГАЧЕНІ ЗРАЗКИ, ВАЛІДАЦІЯ, КРИТЕРІЇ ПРИЙНЯТНОСТІ.

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ENROFLOXACIN AND CIPROFLOXACIN IN CHICKEN SERUM USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUOROMETRIC DETECTION

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

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
melikyansvetlana@gmail.com

Since Ukraine is a member of the World Trade Organization, so it has necessitated the transition of the entire veterinary drugs pharmacy industry to European and world levels and quality standards. Thus, a bill was approved this year which amended the process of state registration of veterinary drugs in the country. Therefore, the developed method is intended for clinical and pharmaceutical studies of veterinary drugs based on the active substances enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin. Target analytes were extracted from the sample using the extraction by dichloromethane for 15 minutes, concentrated by drying and degreased with hexane/carbon tetrachloride. The procedure of sample preparation of fortified blood serum to construct calibration graphs is described in the manuscript. The mobile phase in the chromatographic separation consisted of acetonitrile and citrate buffer solution. The gradient mode of eluents was used during 16 min at a flow rate of 1.5 ml/min. Ciprofloxacin retention time is 8.80 min, and enrofloxacin retention time is 10.45 min. The validation parameters of the method were considered in accordance with the criteria of Council Directive 2002/657/EC and the Eurachem Guide. The specificity of the analytical technique was checked by chromatographic separation of serum sample spiked with enrofloxacin and ciprofloxacin mixture at the concentration of 20 µg/l and blank serum sample. The method is linear in the concentration range of 5.0 - 50.0 µg/l of each analyte. 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 analytes added to the control serum samples. Recovery data are acceptable because they are within ± 10% of the target value. The method has sufficient convergence (accuracy). The evaluation of the intermediate accuracy of enrofloxacin and ciprofloxacin was assessed on three different days of analysis. The main advantages of the developed method are high selectivity and high sensitivity. The limit of detection for enrofloxacin is 0.05 µg/l, and for ciprofloxacin it is 0.02 µg/l, which competes with previously published HPLC/FLD methods for the determination these quinolones.

Keywords: BIOAVAILABILITY, FORTIFIED SAMPLES, VALIDATION, ACCEPTANCE CRITERIA FOR AN ACCEPTABILITY.

Оскільки Україна є членом Всесвітньої організації торгівлі, це, відповідно, зумовило необхідність переходу всієї галузі ветеринарної фармації на європейський і світовий рівні та стандарти якості. Так, цього року схвалено законопроект № 3318 «Про ветеринарну медицину та благополуччя тварин», у якому внесені зміни до процесу державної реєстрації ветеринарних лікарських препаратів в Україні, до вимог їх виробництва та контролю якості відповідно положенням реєстраційного досьє.

Згідно із законопроектом, ефективність, безпечність і показання до застосування ново реєстрованих ветеринарних лікарських засобів-генериків, необхідно оцінювати за рівнем достовірності (доказовості) у дослідах на цільових видах тварин за клінічних досліджень. Клінічні дослідження включають, у першу чергу, біодоступність активної діючої речовини – швидкості і ступеня її потрапляння у системний кровообіг і нагромадження у місці передбачуваної дії та визначення біоеквівалентності (порівняльні дослідження терапевтичної

ефективності референтного препарату і генерика) (Abduieva et al., 2011). Генеричні препарати повинні демонструвати біоеквівалентність, щоб засвідчити те, що їх дія в організмі аналогічна до референтного препарату (Zupanets et al., 2011).

В Україні зареєстровано та перереєстровано більше сорока препаратів ветеринарної медицини на основі енрофлоксацину, половина з яких вітчизняного виробництва (Horzheiev et al., 2013).

Енрофлоксацин відноситься до антибіотиків групи фторхінолонів, що мають широкий спектр антибактеріальної дії, активний відносно більшості грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів: пригнічує бактеріальну ДНК-гіразу, порушує синтез ДНК, ріст і поділ бактерій; викликає виражені морфологічні зміни (у т. ч. в клітинній стінці і мембранах), що призводить до швидкої загибелі бактеріальної клітини. Діє бактерицидно на грамнегативні мікроорганізми у період спокою і ділення та на грампозитивні мікроорганізми – у період поділу (Anderson et al., 2003).

Енрофлоксацин швидко всмоктується в шлунково-кишковому тракті і проникає в усі органи і тканини тварин, за винятком нервової тканини. Максимальна концентрація енрофлоксацину в крові досягається через 1-2 години після застосування лікарського препарату і зберігається протягом 6 год, а терапевтична концентрація – протягом 24 год. Частково метаболізується в печінці з утворенням ципрофлоксацину, що також володіє антибактеріальною активністю (Intorre et al., 1997).

Метою нашої роботи була розробка методики кількісного визначення енрофлоксацину, та його метаболіту ципрофлоксацину, у сироватці крові курчат методом високоефективної рідинної хроматографії для можливості подальших клініко-фармацевтичних досліджень ветеринарних препаратів на основі цих субстанцій.

Матеріали і методи. *Реактиви.* Метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), ацетонітрил (for HPLC, Sigma-Aldrich), гексан (for HPLC, Lab-Scan), дихлорметан (for HPLC, Sigma-Aldrich), чотирихлористий вуглець (чда, Химмед Синтез), калій дигідрогенфосфат (Sigma-Aldrich), цитринова кислота моногідрат (хч, ПО Вітамин), натрій цитрат (Sigma-Aldrich), натрій хлорид (ІМСoPharma), хлоридна кислота (Riedel-de-Haën), та вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore).

Стандарти. У розробці використовували сертифіковані стандартні зразки енрофлоксацину та ципрофлоксацину (Sigma-Aldrich). Розчини стандартів зберігали протягом місяця у щільно закритому посуді у темному місці за температури 2–4 °С.

Обладнання. Рідинний хроматограф Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (виробництво Німеччина) з флуорометричним детектором, обладнаний колонкою Luna C18(2) (5 µm, 150mm × 4,6mm) та передколонкою SecurityGuard (4,0 × 3,0 mm) фірми Phenomenex (США).

Приготування зразків сироватки. Сироватку крові отримували за стандартною процедурою (Levchenko et al., 2002). Зразки зберігали за температури мінус 20 °С. Досліджуваний аналіт екстрагували зі зразка дихлорметаном впродовж 15 хв, концентрували шляхом висушування та знежирювали сумішшю гексан/чотирихлористий вуглець.

Побудова калібрувального графіка. Для побудови калібрувального графіка використовували контрольний (чистий) зразок сироватки крові та зразки, збагачені робочим розчином суміші стандартів енро- та ципрофлоксацину, готували для подальшого аналізу як описано вище. Схема побудови калібрувального кривого графіка представлено у таблиці 1.

Градієнтна система елюентів складається із цитратного буферу (елюент А) та ацетонітрилу (елюент В). Швидкість потоку елюентів встановлювали 1,5 мл/хв. Час розділення – 20 хвилин. Встановлюють хвилю збудження флуорометричного детектору 280 нм., хвиля емісії 450 нм.

Схема побудови калібрувального графіка на робочому розчині суміші фторхінолонів для визначення їх вмісту у сироватці крові курчат

№ п/п	Вміст енрофлоксацину та ципрофлоксацину, мкг/л	Об'єм доданого робочого розчину суміші фторхінолонів, 1 мкг/мл, Мкл
1	0	0
2	5	5
3	10	10
4	20	20
5	30	30
6	50	50

Результати й обговорення. Для пошуку оптимальних умов розділення і кількісного визначення досліджуваних аналітів використовували наявні літературні дані (Intorre, 1997; Canada-Canada, 2012; Haritova, 2012). Першим етапом роботи було ефективне хроматографічне розділення розчину суміші стандартів енрофлоксацину та ципрофлоксацину. Для цього був проведений підбір умов хроматографування, вибір колонки, температури, швидкості потоку, проведений спектральний аналіз та визначена оптимальна довжина хвилі детектування. На основі літературних даних (Canada-Canada et al., 2012), здійснено вибір хімічного складу елюенту А, експериментальним шляхом підібрана достатня концентрація водневих іонів мобільної фази для створення градієнту розділення суміші енро- та ципрофлоксацинів і вибрано хвилі збудження та емісії флуоресцентного детектора.

Після оптимізації градієнтного режиму елюювання, одержано хроматографічні характеристики розділення робочого розчину суміші енрофлоксацину та ципрофлоксацину.

Для даної методики число теоретичних тарілок хроматографічної колонки, обраховане програмою Chromeleon, становить від 48151 до 58452, що узгоджується з вимогами (≥ 2000) до хроматографічних методик (Center for Drugs Evaluation and Research, 1994). Це свідчить про ефективне розділення суміші стандартних розчинів на вибраній колонці для визначення їх кількості у сироватці крові.

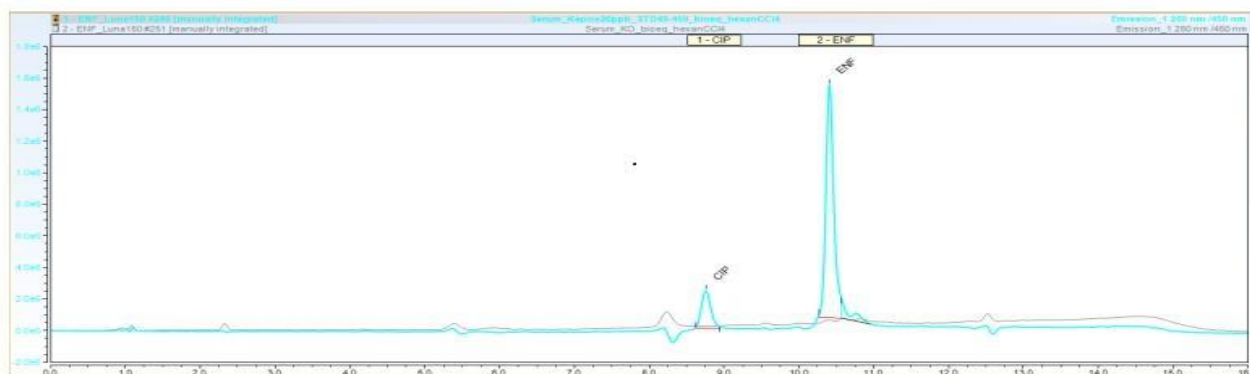


Рис. 1. Хроматограма контрольної (чистої) зразка сироватки крові курчат та зразка, збагаченого стандартним розчином енрофлоксацину та ципрофлоксацину на рівні 20 мкг/л.

Згідно з хроматограмою, на рисунку 1 видно, що градієнт елюентів сприяє ефективному розділенню досліджуваних аналітів за практичної відсутності матричних впливів, спричинених компонентами сироватки крові. Отже, розроблений метод володіє специфічністю. Час утримання піку ципрофлоксацину становить 8,8 хв, а час утримання піку енрофлоксацину – 10,45 хв.

Оцінку придатності запропонованої методики проводили за критерієм «додано-отримано» з використанням контрольної (чистої) матриці. Результати хроматографічного

розділення збагачених стандартними зразками сироватки крові курчат, зображено на рисунку 2.

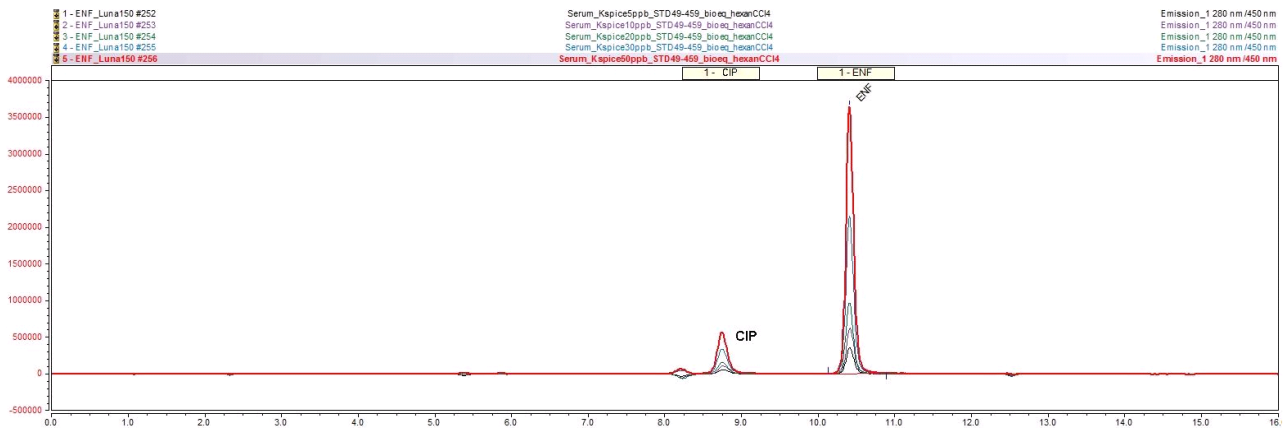


Рис. 2. Хромотограми зразків сироватки крові збагачених різними концентраціями (5, 10, 20, 30, 50 мкг/л) стандартних розчинів енрофлоксацину та ципрофлоксацину.

Калібрувальні графіки будували за результатами вимірювань збагачених зразків сироватки крові з використанням комп'ютерного програмного забезпечення Chromeleon (рис. 3 і 4). У межах вибраного діапазону площі піків енро- та ципрофлоксацину прямо пропорційні їхній концентрації у досліджуваних зразках. Коефіцієнт кореляції для визначення енрофлоксацину становить 0,999937 і 0,999969 – для ципрофлоксацину.

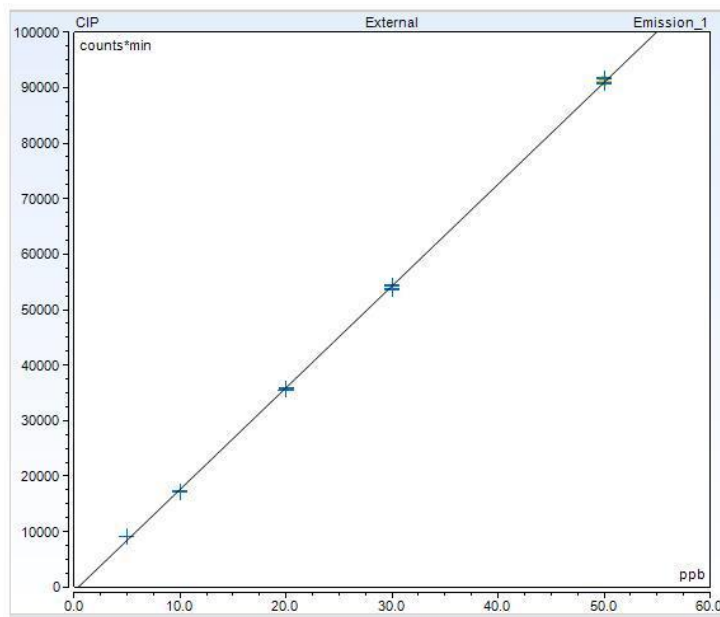


Рис. 3. Залежність площ піків ципрофлоксацину від його концентрацій у збагачених зразках сироватки крові.

Згідно з отриманими даними, межа виявлення (LOD) енрофлоксацину у збагачених зразках сироватки крові становить 0,05 мкг/л, а межа кількісного виявлення (LOQ) – 0,45 мкг/л. Для визначення ципрофлоксацину ці величини становлять 0,02 мкг/л і 0,073 мкг/л, відповідно. Для розрахунку цих даних поправку на холосту пробу не вводили (Mahnusona et al., 2016).

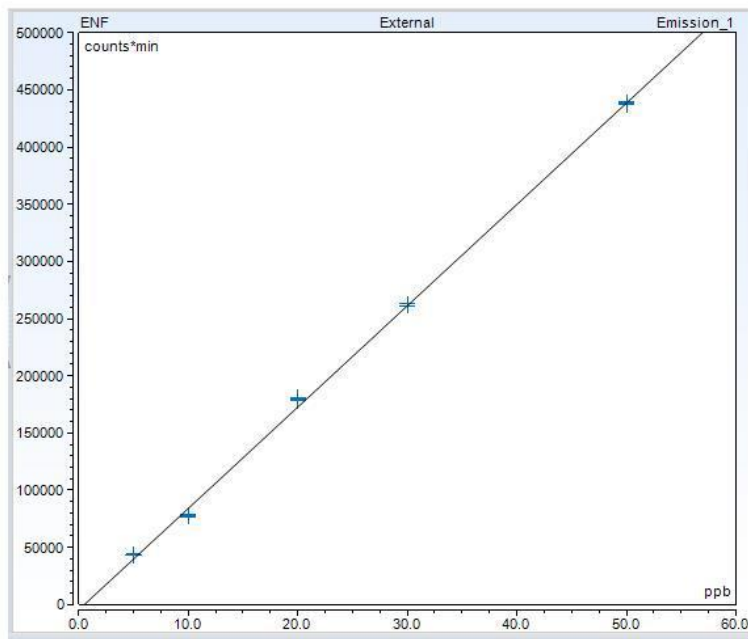


Рис. 4. Залежність площ піків енрофлоксацину від його концентрацій у збагачених зразках сироватки крові.

Визначення точності (близькості отриманих експериментальних результатів до істинного значення кількості аналіту у зразку) проводили шляхом аналізу збагачених зразків сироватки. Для характеристики методу визначали: Σ – середнє арифметичне з 3 аналізів, SD – стандартне відхилення, RSD – відносне стандартне відхилення (обраховується програмою Chromeleon). Кількісним показником точності є відсоток повернення (RP), різниця між очікуваною і отриманою концентрацією аналіту. Цей показник ще називають здатністю витягу розробленої методики. Згідно з вимогами 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 таблиць 2 і 3, відсоток повернення обох аналітів знаходиться у відповідних межах, 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 енрофлоксацину та ципрофлоксацину оцінювали у три різні дні аналізу (табл. 4 та 5). Отримані концентрації досліджуваних аналітів обраховували за калібрувальними кривими збагачених зразків. Для розрахунку межі прецизійності за визначення вмісту енрофлоксацину використали коефіцієнт критичного діапазону $f(3)=3,3$ (Mahnusona et al., 2016).

Таблиця 2

Статистичні дані щодо відсотку повернення стандарту енрофлоксацину у збагачених зразках сироватки крові, n=9

Додано, мкг/л	Отримано Σ , мкг/л	SD	RSD, %	RP, %
5	5,48	0,139	2,52	109,6
10	9,55	0,135	1,39	99,5
20	21,69	0,848	3,84	108,45
30	30,04	0,227	0,757	100,13
50	49,88	0,129	0,19	99,76

Таблиця 3

**Статистичні дані щодо відсотку повернення стандарту ципрофлоксацину
у збагачених зразках сироватки крові, n=9**

Конц., мкг/л	Σ , мкг/л	SD	RSD, %	RP, %
5	5,39	0,040	0,74	107,8
10	9,71	0,021	0,22	97,1
20	19,89	0,075	0,38	99,45
30	29,84	0,212	0,71	99,47
50	50,00	0,130	0,26	100,0

Таблиця 4

**Аналізування статистичних даних щодо проміжної прецизійності результатів
визначення енрофлоксацину (мкг/л)**

Внесено	Отримано			Середнє арифметичне, $\Sigma_{c/3}$	Відхилення кожного значення від середнього арифметичного (Δa)			Середня похибка середнього арифм. значення, σ_r	Абсолютна різниця між найменшим і найбільшим значенням, $ a $	Межа збіжності, $r = f(3) \cdot \sigma_r$	Критерій прийнятності результату, $ a < r$
	1 день	2 день	3 день		1	2	3				
					ден	ден	день				
1	0,97	1,15	1,19	1,10	0,13	0,05	0,09	0,068	0,22	0,2244	Відповідає
5	5,38	5,53	5,54	5,48	0,1	0,05	0,06	0,052	0,16	0,1716	Відповідає
10	9,36	9,25	10,05	9,55	0,19	0,3	0,5	0,25	0,8	0,825	Відповідає
20	20,85	22,24	22,0	21,7	0,85	0,54	0,3	0,43	1,39	1,419	Відповідає
30	30,10	30,10	29,93	30,04	0,06	0,06	0,11	0,057	0,15	0,1881	Відповідає
50	49,96	49,85	49,82	49,88	0,08	0,03	0,06	0,043	0,14	0,1419	Відповідає

Таблиця 5

**Аналізування статистичних даних щодо проміжної прецизійності результатів
визначення ципрофлоксацину (мкг/л)**

Внесено	Отримано			Середнє арифметичне, $\Sigma_{c/3}$	Відхилення кожного значення від середнього арифметичного (Δa)			Середня похибка середнього арифм. значення, σ_r	Абсолютна різниця між найменшим і найбільшим значенням, $ a $	Межа збіжності, $r = f(3) \cdot \sigma_r$	Критерій прийнятності результату, $ a < r$
	1 день	2 день	3 день		1	2	3				
					день	день	день				
5	5,40	5,38	5,21	5,330	-0,07	-0,05	0,12	0,06	0,19	0,199	Відповідає
10	9,72	9,90	9,94	9,853	0,133	-0,047	0,087	0,068	0,22	0,223	Відповідає
20	19,84	19,82	19,96	19,873	0,0333	0,0533	-0,0867	0,044	0,14	0,144	Відповідає
30	29,85	30,10	29,89	29,947	0,0967	-0,1533	0,0567	0,078	0,25	0,256	Відповідає
50	50,00	49,85	49,88	49,910	-0,09	0,06	0,03	0,046	0,15	0,151	Відповідає

Отже, з наведених даних видно, що представлена методика розроблена для низьких меж діапазону концентрацій та володіє більшою чутливістю, порівняно з методиками представленими в літературі (Intorre, 1997; Canada-Canada, 2012; Haritova, 2012). Тобто, є високоспецифічною та високочутливою, що дозволить належним чином провести клінічні дослідження лікарських ветеринарних препаратів (референтних та генеричних) на основі енрофлоксацину.

ВИСНОВКИ

Розроблено чутливу специфічну методику призначену для вивчення біодоступності ветеринарних лікувальних препаратів на основі активних діючих речовин – енрофлоксацину та ципрофлоксацину. Розроблена методика лінійна в діапазоні концентрацій 5 – 50 мкг/л досліджуваних аналітів.

Перспективи досліджень. Велика кількість вироблених в нашій країні генеричних ветеринарних препаратів на основі фторхінолонів потребуватиме для їх реєстрації клінічних досліджень, а, відповідно, застосування розробленої методики.

References

Abduieva, F.M., Bychkova, O.Yu., Bondarenko, I.O., Burda, I.Yu., Vlasenko, O.O., Yehorova, A.Yu. et al. (2011). *Klinichna farmakologhiia: Pidruchnyk dlia studentiv i likariv*. Kharkiv: Khark. Nats. Un-t imeni V.N. Karazina. 405. [in Ukrainian].

Anderson, A.D., Nelson, J.M., Rossiter, S., Angulo, F.J. (2003). Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9, 325–9. doi: 10.1089/107662903322762815.

Canada-Canada, F., Espinosa-Mansilla, A., Jimenez Giron, A., Munos de la Pena, A. (2012). Simultaneous Determination of the Residues of Fourteen Quinolones and Fluoroquinolones in Fish Samples using Liquid Chromatography with Photometric and Fluorescence Detection. *Czech Journ. Food Sciences*. 30 (1). 74-82. doi: 10.17221/12/2010-CJFS.

Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical method and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044) (2002/657/EC) Electronic resource. Access mode: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>

Center for Drugs Evaluation and Research (CDER) (1994). Reviewer Guidance. Validation Chromatographic Methods. Electronic resource. Access mode: <https://vdocument.in/validation-of-chromatographic-methods-fda.html>.

Haritova, A.M., Petrova, D.K., and Stanilova S.A. (2012). A simple HPLC method for detection of fluoroquinolones in serum of avian species. *Jornal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 35, 1130–39. doi: 10.1080/10826076.2011.615100.

Horzheiev, V.M., Kotsiumbas, I.Ya., Kosenko, Yu.M., Chaikivska, O.I, Zaruma L.Ie. (2013) *Dovidnyk veterynarnykh preparativ, Lviv, VF «Afisha», 1596* [in Ukrainian].

Intorre, L., Mengozzi, G., Bertini, S., Bagliacca, S., Luchetti, E and Soldani, G. (1997). The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the muscovy duck. *Vet. Res. Commun.*, 21, 127–36. doi: 10.1023/a:1005773603905.

Levchenko, V.I., Vlizlo, V.V., Kondrakhin I.P., Melnychuk D.O., Apukhovska L.I., Halias V.L. (2002). *Veterynarna klinichna biokhimiia. Bila Tserkva, Bilotserkivskyi derzh. ahrarnyi un-t*, 400. [in Ukrainian].

Mahnusona B., Ernemarka U. (2016). Prydatnist analitychnykh metodiv dlia konkretnoho zastosuvannia. *Nastanova dlia laboratorii z validatsii metodiv ta sumizhnykh pytan. Kyiv, TOV «Iurka Liubchenka»*. 92. [in Ukrainian].

Zupanets. I.A., Starchenko. M.H., Dobrova. V.S. (2011). Rozrobka modeli orhanizatsii klinichnykh vyprobuvan henerychnykh likarskykh zasobiv. *Zaporozhskyi medytsynskyi zhurn*, 13 (4), 23–7. [in Ukrainian].