
ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЭЖХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЛПИДЕМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Ю.А. Хомов, Е.И. Егорова, М. Дайех

Кафедра фармацевтической химии ФДПО и ФЗО
Пермская государственная фармацевтическая академия
ул. Ленина, 48, Пермь, Россия, 614990

Установлены параметры валидации методики определения золпидема в биологических жидкостях на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: золпидем, ВЭЖХ, валидация.

Целью работы явилось проведение валидационной оценки методики ВЭЖХ определения золпидема в биологических жидкостях.

Материалы и методы. ВЭЖХ анализ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02», с УФ-детектором. Аналитическая колонка 3 × 75 мм, сорбент Силасорб 100-5С18, размер частиц 5 мкм. Элюентом избрана смесь ацетонитрил — вода 65 : 35, рН 3 (добавлением фосфорной кислоты). Температура исследования 35 °С. Объем пробы на анализ 5 мкл. Скорость потока элюента 0,75 мл/мин. Спектр поглощения золпидема в УФ-области, снятый в диапазоне от 190 до 360 нм в выбранной подвижной фазе, характеризуется одной полосой поглощения с тремя максимумами и двумя минимумами. Максимум при 240 нм избран в качестве рабочей (опорной) длины волны, при которой хроматографический пик золпидема имел строго симметричную форму. Идентификация золпидема строилась на определении абсолютного времени удерживания, спектральных соотношений, которые рассчитывали в режиме двухволновой детекции при 240/300 нм с опорной длиной волны 240 нм, а также по спектру поглощения, записанному в режиме прибора «спектр». Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием аналитической длины волны.

При валидации для подтверждения фактора линейности, которая устанавливается на основании результатов испытаний, пропорциональных концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической методики строили калибровочный график зависимости площади хроматографического пика от концентрации золпидема на 5 уровнях концентраций его стандартных растворов [1] в вышеназванных условиях. Расчет концентрации осуществляли через программу сбора и обработки данных «Мультихром» по площади пика. Линейная зависимость наблюдалась в интервале концентраций от 5 до 130 мкг/мл. Результаты зависимости аналитического сигнала от концентрации золпидема, представленные графически, показали, что регрессия строго линейна. Критерием приемлемости линейности явился и коэффициент корреляции, его расчетная величина составила 0,9998. Таким образом, в данных интервалах концентраций методика обеспечивает определение золпидема с требуемой линейностью.

Далее оценку пригодности предложенной ВЭЖХ методики осуществляли на примере определения золпидема в крови (тест — ткань), имеющей ведущее значение при фармакокинетических исследованиях, путем постановки серии модельных опытов. Пробоподготовка проводилась из 2 мл крови после трехкратного разбавления образца водой экстракцией метилхлоридом 1 : 2 при pH 8—9. Слой органического растворителя отделяли, испаряли. Остаток растворяли в подвижной фазе для ВЭЖХ анализа [2].

При оценке пригодности хроматографической системы эффективность колонки и асимметрию пиков устанавливали по результатам анализа модельных образцов крови. Для определения сходимости результатов измерения вводили шесть инъекций одного и того же раствора, полученного в результате пробоподготовки модельного образца крови. Все хроматографические параметры устанавливались при помощи интегратора «Мультихром v.1,5». Полученные данные свидетельствуют о значительной эффективности колонки по пику золпидема, не менее 7224 т.т., коэффициент асимметрии укладывается в рекомендуемые интервалы [3]. Рассчитанное стандартное отклонение площадей пиков 1,10 находится в пределах критерия приемлемости ($< 2\%$) и является показателем сходимости инъекций.

Специфичность методики заключается в ее способности достоверно определять анализируемое вещество в присутствии соэкстрактивных балластных веществ и продуктов биodeградации. Для установления специфичности по предлагаемой методике ВЭЖХ анализировали модельный образец крови, образец крови плацебо и стандартный раствор золпидема в подвижной фазе. Полученные данные показали отсутствие пиков на хроматограммах образцов плацебо, совпадающих по времени удерживания с пиком золпидема, и подтверждают, что пик с временем удерживания золпидема на хроматограмме модельного образца крови принадлежит именно золпидему и совпадает с пиком стандартного раствора. Рассматриваемая методика валидна по показателю специфичности. Таким образом, полученные результаты находятся в пределах рекомендуемых [3], что позволяет сделать вывод о пригодности хроматографической системы.

Зависимость площадей пиков от концентрации золпидема в модельных образцах крови также линейна в аналитической области измерений. Рассчитанный коэффициент линейной корреляции составил 0,9994.

Результаты количественного определения золпидема в крови (плазма) приведены в табл. 1.

Таблица 1

Количественное определение золпидема в крови методом ВЭЖХ

Концентрация золпидема в модельной смеси, мкг/мл	Найдено золпидема после изолирования		Метрологические характеристики
	мкг/мл	%	
5	3,56	71,24	s = 2,60 s \bar{x} = 1,16 $\Delta\bar{x}$ = 3,32 \bar{e} = 4,38
	3,71	74,18	
	3,76	75,20	
	3,52	70,34	
	3,81	76,43	
	\bar{x}_{cp} 3,67	73,48	

Окончание

Концентрация золпидема в модельной смеси, мкг/мл	Найдено золпидема после изолирования		Метрологические характеристики
	мкг/мл	%	
25	18,98	75,90	$s = 1,85$ $s\bar{x} = 0,83$ $\Delta\bar{x} = 2,31$ $\bar{\epsilon} = 3,03$
	19,46	77,85	
	18,52	74,10	
	19,63	78,54	
	18,78	75,19	
	\bar{x}_{cp} 19,07	76,32	
50	37,43	74,87	$s = 1,82$ $s\bar{x} = 0,81$ $\Delta\bar{x} = 2,25$ $\bar{\epsilon} = 2,95$
	38,74	77,48	
	36,99	73,99	
	38,95	77,90	
	38,85	77,70	
	\bar{x}_{cp} 38,19	76,39	

При статистической обработке данных, полученных в ходе количественного определения золпидема в модельных пробах плазмы на трех уровнях концентраций, отражается вполне удовлетворительная сходимость результатов в пределах рекомендуемой аналитической области.

Предел обнаружения методом ВЭЖХ по соотношению сигнал — шум составил для золпидема в плазме 0,90 мкг/мл.

Разработанная методика определения золпидема методом ВЭЖХ отличается линейностью, правильностью, повторяемостью, селективностью и может быть рекомендована для использования в его химико-токсикологическом анализе биологических жидкостей.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Аладышева Ж.И., Беляев В.В., Береговых В.В. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик // Фармация. — 2008. — № 7. — С. 9 — 14.
- [2] Хомов Ю.А., Егорова Е.И., Кокиарова Н.В. и др. Химико-токсикологический анализ золпидема // Вестник РУДН, серия «Медицина». — 2009. — № 4. — С. 469—473.
- [3] Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. — 2004. — № 4. — С. 40 — 56.

THE VALIDATION OF METHOD HPLC DETERMINATION OF ZOLPIDEM IN BIOLOGICAL LIQUIDS

Y.A. Khomov, E.I. Egorova, M. Dayeh

Department of Pharmaceutical Chemistry FDPO PSFA
 Pharmaceutical academy
 Lenina str., 48, Perm, Russia, 614990

The present study is devoted to validation of method HPLC determination of zolpidem in biological liquids.

Key words: zolpidem, HPLC, the validation.