

Walidacja i adaptacja metody HPLC-UV oznaczania metabolitów metamizolu w osoczu ludzkim w badaniu klinicznym

Validation and adaptation of a HPLC-UV method for the determination of metamizole metabolites in human plasma in a clinical trial

Patrycja Ciabach¹, Hanna Urjasz², Arkadiusz Spychała³, Elżbieta Długosz³, Witold Kycler³, Edyta Szalek²

¹ Uczestnik projektu o charakterze wdrożeniowym w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój (POWER): Masters of Didactics, studentka V roku Farmacji, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

² Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

³ Oddział Chirurgii Onkologicznej Chorób Przewodu Pokarmowego, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Streszczenie

Metamizol to lek o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym oraz spazmolitycznym. Aktywność farmakologiczną wykazują jego metabolity – 4-metyloamino-antypiryna (MAA) oraz 4-amino-antypiryna (AA). Opracowano i poddano walidacji metodę oznaczania aktywnych metabolitów metamizolu w osoczu ludzkim za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV (HPLC-UV). Krzywe kalibracyjne potwierdzają zależność liniową dla stężeń od 0,1 do 10,0 [µg/ml] dla MAA oraz od 0,05 do 1,5 [µg/ml] dla AA. Precyzję i dokładność oznaczono dla pojedynczej serii oraz między seriami dla próbek o stężeniu LLOQ, 3xLLOQ, średnim i wysokim. Wykonano badanie stabilności, a także określono selektywność oraz odzysk. Odzysk wyniósł 99% dla MAA o stężeniu 9,0 µg/ml oraz 83% dla stężenia AA wynoszącego 1,2 µg/ml. Wszystkie parametry walidacji mieszczą się w granicach norm ustalonych przez Agencję Żywności i Leków (FDA) i Europejską Agencję Leków (EMA). Wykorzystując zwalidowaną metodę HPLC-UV oznaczono stężenia MAA i AA u 4 pacjentów, po resekcji żołądka, którzy otrzymali doustnie 500 mg metamizolu. Porównano parametry farmakokinetyczne tych pacjentów z parametrami wyznaczonymi po podaniu takiej samej dawki metamizolu zdrowym mężczyznom. Wyniki wskazują na prawie 4-krotnie wyższe stężenie maksymalne MAA, natomiast dla AA 8-krotnie wyższe u zdrowych osób. Stężenie maksymalne jest uzyskiwane szybciej u pacjentów po resekcji żołądka. (*Farm Współ* 2020; 13: 3-12)

Słowa kluczowe: metamizol, metabolity, HPLC-UV, osocze ludzkie, walidacja, farmakokinetyka

Abstract

Metamizole is an analgesic, antipyretic and spasmolytic drug. Pharmacological activity is demonstrated by its metabolites – 4-methylamino-antipyrine (MAA) and 4-amino-antipyrine (AA). The method for the determination of active metabolites of metamizole in human plasma using high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV) was developed and validated. The calibration curves confirm the linear relationship for concentrations from 0.1 to 10.0 [µg/ml] for MAA and from 0.05 to 1.5 [µg/ml] for AA. Precision and accuracy were determined for a single series and between series for samples with LLOQ, 3xLLOQ, medium and high concentration. Stability tests were performed. Selectivity and recovery were determined. Recovery was 99% for MAA at 9.0 µg/ml and 83% for AA at 1.2 µg/ml. All validation parameters are within the standards set by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). Using the validated HPLC-UV method, MAA and AA concentrations were determined in 4 patients after gastrectomy. They received 500 mg metamizole orally. The pharmacokinetic parameters of these patients were compared with parameters determined after administration of the same dose of metamizole to healthy men. The results indicate that the concentration of MAA is

almost 4 times higher, whereas for AA it is 8 times higher in healthy people. Maximum concentration is obtained faster in patients after gastrectomy. (*Farm Współ* 2020; 13: -12)

Keywords: metamizole, metabolites, HPLC-V, human plasma, validation, pharmacokinetics

Wstęp

Metamizol, podobnie jak paracetamol, należy do grupy nieopiodowych leków przeciwbólowych. Wykazuje działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i spazmolityczne. Jest to prolek, który ulega metabolizmowi w warunkach *in vivo*. Do metabolitów metamizolu należą: 4-metyloamino-antypiryna (MAA), 4-amino-antypiryna (AA), 4-acetylo-amino-antypiryna (AAA) oraz 4-formylo-amino-antypiryna (FAA). Działanie farmakologiczne wykazują pierwsze dwa z nich [1]. Wzory chemiczne metamizolu oraz jego dwóch aktywnych metabolitów przedstawiono na rycinie 1 [2].

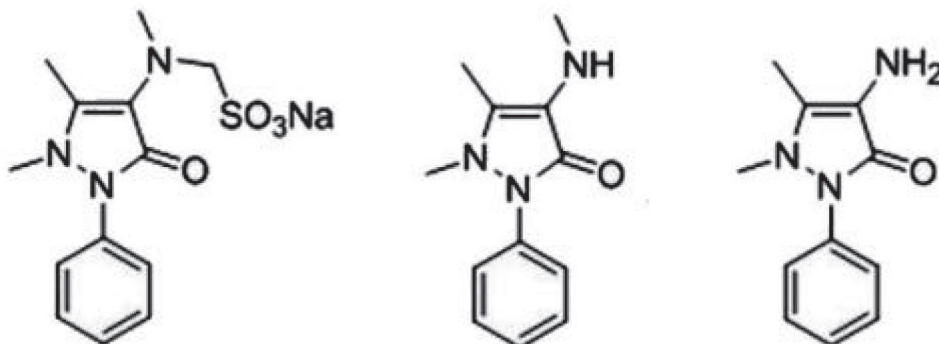
Metabolity metamizolu charakteryzują się wiązaniem z białkami na poziomie poniżej 60%. Dla MAA jest to 58%, natomiast AA wiąże się w 48%. Działanie wykazuje przede wszystkim 4-metyloamino-antypiryna, której objętość dystrybucji wynosi 1,15 l/kg beztłuszczowej masy ciała, a stężenie maksymalne występuje po 1,2-2,0 godzinach od podania leku. Biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji wynosi $2,7 \pm 0,5$ godziny, natomiast klirens nerkowy, po zastosowaniu doustnym pojedynczej dawki 1 g metamizolu, wynosi dla MAA 5 ± 2 ml/min [3].

Na farmakokinetykę leków może wpływać wiele czynników. Jednym z nich jest płeć. W przypadku metamizolu różnica występuje w reakcji acetylacji AA, która jest bardziej wydajna u kobiet niż u mężczyzn.

Na metabolizm ma wpływ również wiek. Badanie przeprowadzone przez Martínez i wsp. wykazało, że wraz z wiekiem zwiększa się stężenie MAA, natomiast zmniejsza się stężenie FAA [4]. U dzieci eliminacja metabolitów metamizolu zachodzi szybciej niż u dorosłych. Marskość wątroby jest czynnikiem powodującym zmniejszenie klirensu wszystkich metabolitów leku, natomiast w niewydolności nerek obserwuje się osłabione wydalanie AAA i FAA [5]. Podwyższone stężenie MAA było obserwowane u pacjentów chorujących na cukrzycę i stosujących insulinoterapię [6]. Metamizol jest lekiem dość często stosowanym u pacjentów po zabiegach chirurgicznych, m.in. po resekcji żołądka, która jest jedyną skuteczną metodą postępowania w przypadku raka żołądka. Skutki gastrektomii to brak lub zmniejszona objętość żołądka i powierzchnia wchłaniania, zmniejszona kwasowość oraz przyspieszone opróżnianie żołądka. Mogą mieć one wpływ na farmakokinetykę leków przyjmowanych doustnie [7].

Celem pracy była walidacja metody HPLC-UV (Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV, ang. *High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet detection*) oznaczania dwóch aktywnych metabolitów metamizolu w osoczu ludzkim oraz wykorzystanie metody do badań farmakokinetyki tych związków u pacjentów po całkowitej gastrektomii.

Metabolity metamizolu można również oznaczyć przy wykorzystaniu innych metod, takich jak:



Rycina 1. Wzory przedstawiają kolejno metamizol, MAA oraz AA [2]

Figure 1. Chemical structures of metamizole, MAA and AA [2]

Oznaczone stężenia wzorców kalibracyjnych nie mogą się różnić o więcej niż 15% względem stężeń nominalnych, natomiast w przypadku LLOQ dopuszczalna jest różnica na poziomie 20% [12-14].

Stabilność

Ocenę stabilności przeprowadza się po to, aby mieć pewność, że poszczególne etapy przygotowania i analizy próbki oraz warunki przechowywania nie powodują zmian stężenia analitu. Wykorzystywane materiały i sprzęt w testach stabilności oraz warunki powinny być zbliżone do tych, które są stosowane w przypadku rzeczywistych próbek.

W testach stabilności ocenia się stabilność roztworu wzorca wewnętrznego oraz roztworów podstawowych analitu. Ponadto, należy ocenić krótkotrwałą stabilność analitu w temperaturze pokojowej, stabilność podczas zamrażania i rozmrażania oraz długoterminową stabilność podczas przechowywania w zamrażarce. W niektórych przypadkach wykonuje się również testy stabilności dla ekstraktów znajdujących się w autosamplerze.

Próbki analizuje się na podstawie krzywej kalibracyjnej. Uzyskane stężenia porównuje się ze stężeniami nominalnymi. Stabilność wyraża się jako % różnicy pomiędzy tymi wartościami i oblicza według wzoru:

$$\Delta\% = \frac{C_0 - C_i}{C_0 + C_i} \times 200$$

gdzie:

C_0 – początkowe stężenie substancji

C_i – stężenie substancji oznaczone po danym czasie

Oznaczone stężenia nie powinny się różnić od nominalnego o więcej niż 15% [10,15,16].

Selektywność

Metoda określana jest jako selektywna, kiedy możliwe jest jednoznaczne rozróżnienie i oznaczenie ilościowe analitu spośród innych związków obecnych w matrycy np. zanieczyszczeń, metabolitów lub składników matrycy. Selektywność ocenia się poprzez analizę pików obecnych w ślepej próbce w pobliżu czasu retencji analitu oraz wzorca wewnętrznego.

Kryteria akceptacji wynoszą 20% odpowiedzi dla LLOQ w przypadku analitu, natomiast dla wzorca wewnętrznego zakłócenia nie mogą przekraczać 5% odpowiedzi dla tej substancji [14,17].

Odzysk

Odzysk odnosi się do wydajności ekstrakcji w danej metodzie analitycznej. Wyrażony jest jako procent znanej ilości analitu, który przechodzi przez wszystkie etapy obróbki. Porównuje się pola powierzchni pików próbek o stężeniu niskim, średnim i wysokim, które zostały poddane ekstrakcji z polami powierzchni pików wyekstrahowanych ślepych próbek z dodanymi później roztworami o odpowiednich stężeniach reprezentujących 100% odzysku.

Odzysk obliczany jest ze wzoru:

$$R\% = \frac{C_{wzb} - C_{nwzb}}{C_{dod}} \times 100$$

gdzie:

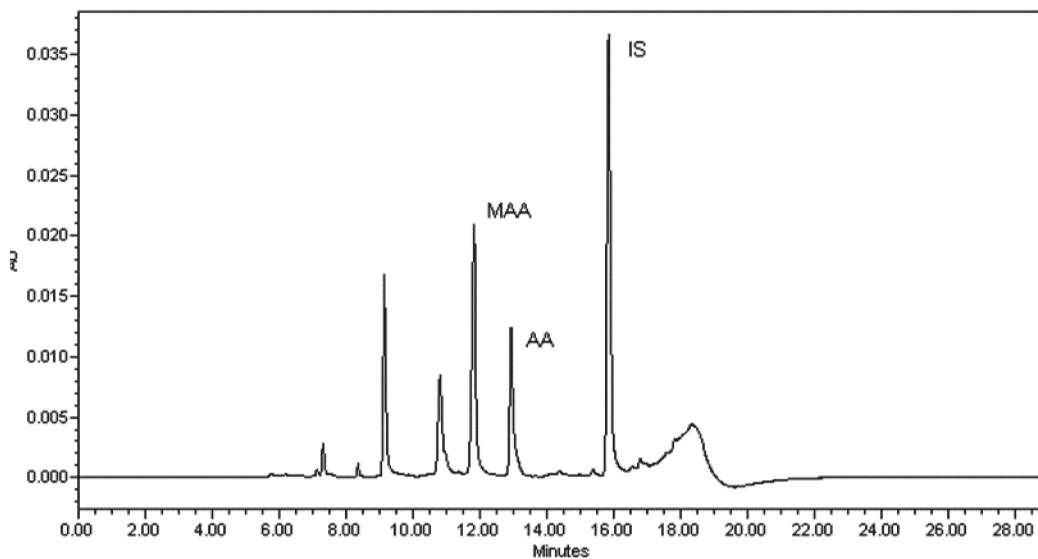
C_{wzb} – stężenie substancji wzbogaconej

C_{nwzb} – stężenie substancji niewzbogaconej

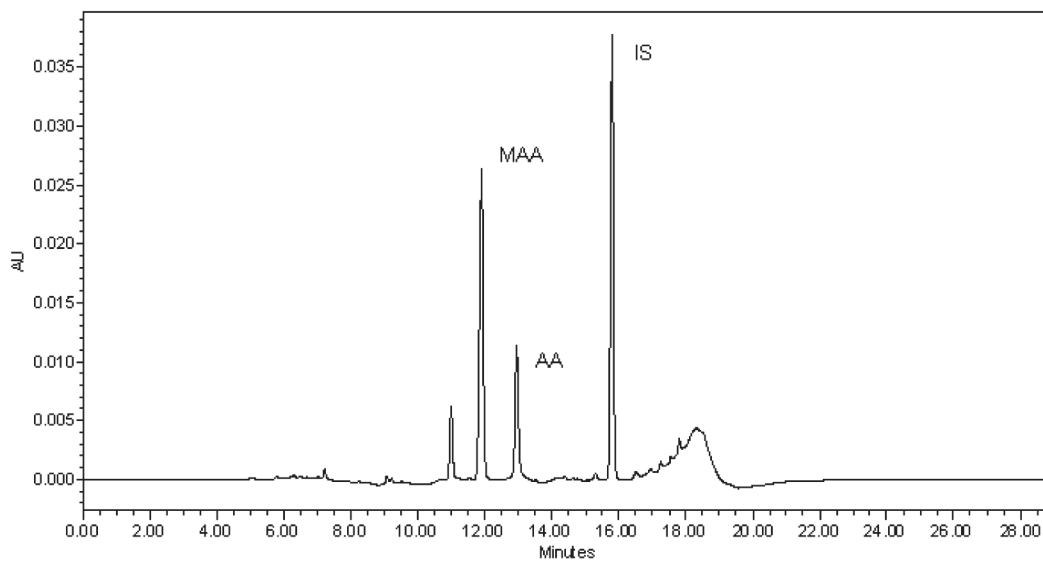
C_{dod} – stężenie substancji dodanej do próbki [14,15]

Przygotowanie próbek

Metabolity metamizolu wyodrębnia się poprzez ekstrakcję do fazy ciekłej. W szklanych probówkach umieszcza się 475 μ l badanego osocza i dodaje się 25 μ l wzorca wewnętrznego (roztwór fenacetyny o stężeniu 250 μ g/ml). Następnie dodaje się 100 μ l roztworu 1M NaOH i dokładnie miesza na wortexie. W kolejnym etapie należy dodać 4 ml mieszaniny octanu etylu i chloroformu w stosunku objętościowym 3:7, wytrząsać na wytrząsarce przez 20 minut przy obrotach 1000, a później wirować przez 20 minut przy obrotach 4000 w temperaturze 10°C. Ostrożnie przenieść 3,5 ml warstwy organicznej do suchych probówek i odparować rozpuszczalnik w koncentratorze (60°C, 30 min). Do suchej pozostałości dodano 80 μ l fazy ruchomej (w startowym składzie), miesza na wortexie 2 minuty w temperaturze pokojowej i ogrzewa w łaźni wodnej o temperaturze około 35°C. Po 5 minutach ogrzewania, probówki odstawia się na 1 minutę i przenosi do insertów. Chromatogramy przykładowych próbek zamieszczono na rycinach 2 i 3.



Rycina 2. Chromatogram próbki osocza od pacjenta ($C_{MAA} = 2,097 \mu\text{g/ml}$, $C_{AA} = 0,657 \mu\text{g/ml}$)
 Figure 2. Chromatogram of a patient's plasma sample ($C_{MAA} = 2,097 \mu\text{g/ml}$, $C_{AA} = 0,657 \mu\text{g/ml}$)



Rycina 3. Chromatogram próbki QC ($C_{MAA} = 3 \mu\text{g/ml}$; $C_{AA} = 0,6 \mu\text{g/ml}$)
 Figure 3. Chromatogram of the QC sample ($C_{MAA} = 3 \mu\text{g/ml}$; $C_{AA} = 0,6 \mu\text{g/ml}$)

Analiza farmakokinetyczna

Adaptację zwalidowanej metody HPLC-UV przeprowadzono na osoczu czterech pacjentów po całkowitej gastrektomii, którzy otrzymali doustnie 500 mg metamizolu (Pyralgina[®]). Na badanie uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej (nr 993/18 z dnia 11 października 2018 r.). Badanie zostało wykonane we współpracy z Oddziałem Chirurgii Onkologicznej Chorób Przewodu Pokarmowego (Wielkopolskie Centrum Onkologii).

Próbki krwi (2 ml) zostały pobrane od pacjentów w następujących punktach czasowych: 0 (przed podaniem leku), 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24h po podaniu metamizolu. Po oznaczeniu stężeń w osoczu dwóch aktywnych metabolitów metamizolu MAA i AA wyznaczono i obliczono następujące parametry farmakokinetyczne (przy użyciu programu WinNonlin[®] Professional Version 5.3; Pharsight[®] Corp., USA): pole powierzchni pod krzywą zależności $c = f(t)$ – AUC, stężenie maksymalne – C_{max} , czas wystąpienia stężenia maksymalnego w osoczu – t_{max} , biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji – $t_{0,5}$, stałą szybkości eliminacji – K_{el} , pole powierzchni pod pierwszym momentem krzywej $c \cdot t = f(t)$ – AUMC, średni czas przebywania leku w organizmie – MRT.

Wyniki i dyskusja

Walidacja metody analitycznej została przeprowadzona w oparciu o wytyczne EMA z 21.07.2011.

W celu zbadania precyzji metody dla jednej serii wykonano pięć oznaczeń dla próbek o następujących stężeniach 4-metyloamino-antypiryny: 0,1; 0,3; 4,0; 9,0 [$\mu\text{g/ml}$] oraz 4-amino-antypiryny: 0,05; 0,15; 0,5; 1,2 [$\mu\text{g/ml}$]. Wyniki przedstawiono w tabelach II i III.

Oznaczenia były przeprowadzane w trzech różnych dniach. Miało to na celu określenie precyzji metody między seriami. Wyniki przedstawiono w tabelach IV i V.

W celu zbadania dokładności metody wykonano pięć oznaczeń dla próbek o następujących stężeniach 4-metyloamino-antypiryny: 0,1; 0,3; 4,0; 9,0 [$\mu\text{g/ml}$] oraz 4-amino-antypiryny: 0,05; 0,15; 0,5; 1,2 [$\mu\text{g/ml}$]. Wyniki przedstawiono w tabelach VI i VII.

Tak, jak w przypadku oznaczania precyzji, tutaj również zostały wykonane oznaczenia podczas trzech różnych dni, aby móc wyznaczyć dokładność metody między seriami. Wyniki przedstawiono w tabelach VIII i IX.

Tabela II. Precyzja metody wykonana dla jednej serii – oznaczenie stężeń 4-metyloamino-antypiryny

Table II. Precision of the method made for one series – determination of 4-methylamino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]					S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	CV [%]
0,1	0,111	0,111	0,092	0,112	0,091	0,103	0,011	10,52
0,3	0,337	0,333	0,277	0,289	0,323	0,312	0,027	8,70
4,0	3,547	3,417	3,790	3,787	3,784	3,665	0,173	4,73
9,0	10,27	9,275	10,145	9,945	10,056	9,938	0,389	3,92

Tabela III. Precyzja metody wykonana dla jednej serii – oznaczenie stężeń 4-amino-antypiryny

Table III. Precision of the method made for one series – determination of 4-amino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]					S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	CV [%]
0,05	0,046	0,057	0,042	0,050	0,056	0,050	0,006	12,79
0,15	0,166	0,155	0,140	0,123	0,126	0,142	0,018	13,01
0,5	0,499	0,476	0,571	0,528	0,502	0,515	0,036	7,03
1,2	1,188	1,359	1,346	1,243	1,180	1,263	0,085	6,74

Tabela IV. Precyzja metody wykonana między seriami – oznaczenie stężeń 4-metyloamino-antypiryny

Table IV. Precision of the method made between series – determination of 4-methylamino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]			S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	CV [%]
0,1	0,103	0,102	0,085	0,097	0,010	10,46
0,3	0,312	0,285	0,298	0,298	0,014	4,53
4,0	3,665	3,581	3,662	3,636	0,048	1,31
9,0	9,938	9,797	10,027	9,921	0,116	1,17

Table V. Precyzja metody wykonana między seriami – oznaczenie stężeń 4-amino-antypiryny

Table V. Precision of the method made between series – determination of 4-amino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]			S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	CV [%]
0,05	0,05	0,056	0,051	0,052	0,003	6,14
0,15	0,142	0,156	0,147	0,148	0,007	4,78
0,5	0,515	0,474	0,506	0,498	0,022	4,32
1,2	1,263	1,071	1,046	1,127	0,119	10,54

Tabela VI. Dokładność metody wykonana dla jednej serii – oznaczenie stężeń 4-metyloamino-antypiryny

Table VI. Accuracy of the method for one series – determination of 4-methylamino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]					S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	% błędu [%]
0,1	0,111	0,111	0,092	0,112	0,091	0,103	0,011	3,40
0,3	0,337	0,333	0,277	0,289	0,323	0,312	0,027	3,93
4,0	3,547	3,417	3,790	3,787	3,784	3,665	0,173	8,38
9,0	10,27	9,275	10,145	9,945	10,056	9,938	0,389	10,42

Tabela VII. Dokładność metody wykonana dla jednej serii – oznaczenie stężeń 4-amino-antypiryny

Table VII. Accuracy of the method for one series – determination of 4-amino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]					S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	% błędu [%]
0,05	0,046	0,057	0,042	0,050	0,056	0,050	0,006	0,40
0,15	0,166	0,155	0,140	0,123	0,126	0,142	0,018	5,33
0,5	0,499	0,476	0,571	0,528	0,502	0,515	0,036	3,04
1,2	1,188	1,359	1,346	1,243	1,180	1,263	0,085	5,27

Tabela VIII. Dokładność metody wykonana między seriami – oznaczenie stężeń 4-metyloamino-antypiryny

Table VIII. Accuracy of the method carried out between series – determination of 4-methylamino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]			S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	% błędu [%]
0,1	0,103	0,102	0,085	0,097	0,010	3,33
0,3	0,312	0,285	0,298	0,298	0,014	0,56
4,0	3,665	3,581	3,662	3,636	0,048	9,10
9,0	9,938	9,797	10,027	9,921	0,116	10,23

Tabela IX. Dokładność metody wykonana między seriami – oznaczenie stężeń 4-amino-antypiryny

Table IX. Accuracy of the method carried out between series – determination of 4-amino-antipyrine concentrations

C_{teor} [$\mu\text{g/ml}$]	C_{obi} [$\mu\text{g/ml}$]			S [$\mu\text{g/ml}$]	SD	% błędu [%]
0,05	0,05	0,056	0,051	0,052	0,003	4,67
0,15	0,142	0,156	0,147	0,148	0,007	1,11
0,5	0,515	0,474	0,506	0,498	0,022	0,33
1,2	1,263	1,071	1,046	1,127	0,119	6,11

Do oznaczenia liniowości wykorzystano następujące metabolity antypiryny: 4-metyloamino-antypirynę o stężeniach 0,1; 0,15; 0,2; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0 [$\mu\text{g/ml}$] oraz 4-amino-antypirynę o stężeniach 0,05;

0,07; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 [$\mu\text{g/ml}$]. Wyznaczono wykresy kalibracyjne i parametry krzywych, które przedstawione są w tabeli X.

Wykonano badanie stabilności dla roztworów

Tabela X. Równania i parametry krzywych kalibracyjnych dla 4-metyloamino-antypiryny

Table X. Equations and parameters of calibration curves for 4-methylamino-antipyrine

	Krzywa I	Krzywa II	Krzywa III
Równanie krzywej	$y = 3,26 \times 10^{-2}x - 3,22 \times 10^{-3}$	$y = 3,32 \times 10^{-2}x - 1,06 \times 10^{-3}$	$y = 3,72 \times 10^{-2}x - 2,69 \times 10^{-3}$
Współczynnik kierunkowy a	$3,26 \times 10^{-2}$	$3,32 \times 10^{-2}$	$3,72 \times 10^{-2}$
Współczynnik przesunięcia b	$-3,22 \times 10^{-3}$	$-1,06 \times 10^{-3}$	$-2,69 \times 10^{-3}$
Współczynnik korelacji r	0,9994	0,9967	0,9999

Tabela XI. Równania i parametry krzywych kalibracyjnych dla 4-amino-antypiryny

Table XI. Equations and parameters of calibration curves for 4-amino-antipyrine

	Krzywa I	Krzywa II	Krzywa III
Równanie krzywej	$y = 6,29 \times 10^{-2}x - 3,21 \times 10^{-3}$	$y = 7,19 \times 10^{-2}x - 1,11 \times 10^{-3}$	$y = 5,43 \times 10^{-2}x - 7,79 \times 10^{-4}$
Współczynnik kierunkowy a	$6,29 \times 10^{-2}$	$7,19 \times 10^{-2}$	$5,43 \times 10^{-2}$
Współczynnik przesunięcia b	$-3,21 \times 10^{-3}$	$-1,11 \times 10^{-3}$	$-7,79 \times 10^{-4}$
Współczynnik korelacji r	0,9994	0,9989	0,9962

4-metyloamino-antypiryny i 4-amino-antypiryny podczas przechowywania w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin, w temperaturze -20°C w czasie 24 godzin oraz 1 miesiąca. Przeprowadzono również test rozmrażania, a także zbadano stabilność w auto-samplerze. Badania wykazały stabilność próbek we wszystkich warunkach.

Badanie odzysku przeprowadzono dla metabolitów metamizolu o następujących stężeniach: $9,0 \mu\text{g/ml}$ dla roztworu 4-metyloamino-antypiryny oraz $1,2 \mu\text{g/ml}$ dla roztworu 4-amino-antypiryny. Uzyskano odzysk na poziomie 99% dla MAA i 83% dla AA.

Z analizy pików obecnych w ślepej próbie w pobliżu czasu retencji analitu oraz wzorca wewnętrznego wynika, że metoda jest selektywna.

Według piśmiennictwa, MAA w osoczu ludzkim można także oznaczyć za pomocą metody LC-MS. Pozwala ona na szybkie uzyskanie wyniku. Precyzja tej metody w ciągu dnia wynosi od 1 do 11%, a między seriami od 5 do 9%. Natomiast dokładność metody w ciągu dnia wynosi od 92 do 110%, a między seriami od 96 do 102%. Odzysk MAA to średnio 80% [9]. Metoda LC-MS jest jednak kosztowna i nie zawsze dostępna. Dlatego w pracy przedstawiono wyniki walidacji i adaptacji metody HPLC-UV, która pozwala

oznaczyć z wystarczającą precyzją i dokładnością stężenia dwóch aktywnych metabolitów metamizolu MAA i AA. Ograniczeniem przedstawionej metody jest brak możliwości oznaczenia pozostałych metabolitów analgetyku, których stężenia były poniżej LLOQ. Są one jednak pozbawione aktywności farmakologicznej, dlatego ostatecznie nie stanowiły celu badania. Przy wykorzystaniu zwalidowanej metody HPLC-UV oznaczono stężenia MAA i AA u 4 pacjentów, 2 kobiet i 2 mężczyzn, po resekcji żołądka, którzy otrzymywali metamizol doustnie w dawce 500 mg. Parametry farmakokinetyczne obu aktywnych metabolitów metamizolu, obliczone z wykorzystaniem farmakokinetyki bezmodelowej, przedstawiono w tabeli VI. Porównując wartości stężeń maksymalnych (C_{max}) wyznaczonych u zdrowych mężczyzn po podaniu takiej samej dawki metamizolu, można zauważyć, że są to wartości znacznie wyższe niż w przypadku analizowanych pacjentów po resekcji żołądka. Dla MAA są to wartości prawie 4-krotnie wyższe, natomiast dla AA 8-krotnie. Stężenie maksymalne jest uzyskiwane szybciej u pacjentów po resekcji żołądka o około 0,5 h dla MAA oraz o około 0,8 h dla AA [18]. Co ciekawe, mimo zbliżonych wartości C_{max} , wartość ekspozycji na MAA, mierzona AUC_{0-1} , jest niemal dwukrotnie większa w grupie mężczyzn

w porównaniu do wartości u kobiet. Zaobserwowane różnice wymagają potwierdzenia na większej grupie badanej.

Przygotowanie precyzyjnej, dokładnej i czułej metody analitycznej umożliwia jej wykorzystanie w kontynuacji powyższego badania oraz innych

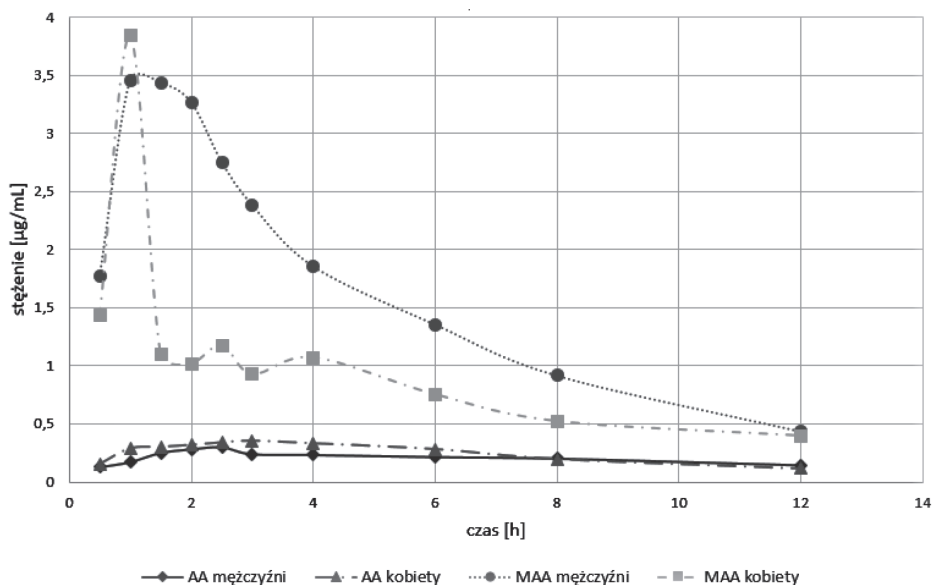
badaniach farmakokinetyki metabolitów metamizolu u pacjentów.

Zmiany wartości średnich stężeń w czasie dla obu aktywnych metabolitów metamizolu, MAA i AA, z uwzględnieniem płci pacjentów po resekcji żołądka, przedstawiono na wykresie 1.

Tabela XII. Parametry farmakokinetyczne aktywnych metabolitów metamizolu, MAA i AA, wyznaczone i obliczone u czterech pacjentów po resekcji żołądka

Table XII. Pharmacokinetic parameters of active metabolites of metamizole, MAA and AA, determined and calculated in four patients after gastrectomy

Parametry farmakokinetyczne	MAA		AA	
	S ± SD (CV%) kobiety	S ± SD (CV%) mężczyźni	S ± SD (CV%) kobiety	S ± SD (CV%) mężczyźni
C _{max} (µg/mL)	3,84 ± 0,97 (25,2%)	3,55 ± 1,84 (51,90%)	0,36 ± 0,30 (83,7%)	0,31 ± 0,07 (24,03%)
t _{max} (h)	1,00 ± 0,00 (0,0%)	1,25 ± 0,35 (28,28%)	3,00 ± 0,00 (0,0%)	2,25 ± 0,35 (15,71%)
K _{el} (1/h)	0,152 ± 0,081 (53,35%)	0,189 ± 0,030 (15,94%)	0,103 ± 0,026 (25,32%)	0,056 ± 0,018 (32,58%)
AUC _{0-t} (hxµg/mL)	10,44 ± 0,24 (2,3%)	20,60 ± 15,20 (73,79%)	3,46 ± 2,92 (84,4%)	3,79 ± 1,98 (52,16%)
AUC _{inf} (hxµg/mL)	13,83 ± 2,75 (19,9%)	21,32 ± 15,02 (70,45%)	4,27 ± 2,91 (68,1%)	5,65 ± 3,76 (66,58%)
AUMC _{0-t} (h, µg/mL)	45,11 ± 7,19 (15,9%)	108,45 ± 99,57 (91,81%)	24,51 ± 23,28 (95,0%)	36,64 ± 23,15 (63,19%)
MRT _{0-t} (h)	4,33 ± 0,79 (18,2%)	4,78 ± 1,30 (27,24%)	6,58 ± 1,17 (17,7%)	9,34 ± 1,23 (13,21%)



Wykres 1. Wykres zależności średnich stężeń metabolitów metamizolu, MAA i AA, od czasu u pacjentów po resekcji żołądka

Graph 1. Mean plasma concentration-time profiles for active metamizole metabolites, MAA and AA, in patients after gastrectomy

Podziękowania/Acknowledgments

Publikacja została przygotowana w ramach projektu o charakterze wdrożeniowym w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój (POWER): Masters of Didactics.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Autor do korespondencji:

✉ Patrycja Ciabach
Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
ul. Św. Marii Magdaleny 14; 61-052 Poznań
☎ (+48 61) 66878 54
✉ patijal6@gmail.com

Piśmiennictwo/References

- Collares EF, Troncon LEA. Effects of dipyron on the digestive tract. *Braz J Med Biol Res.* 2019;52(2):e8103.
- Bachmann F, Duthaler U, Rudin D, Krähenbühl S, Haschke M. N-demethylation of N-methyl-4-aminoantipyrine, the main metabolite of metamizole. *Eur J Pharm Sci.* 2018;120:172-80.
- Charakterystyka produktu leczniczego Pyralgina, 500 mg, tabletki (data wejścia: 10.01.2020).
- Martínez C, Andreu I, Amo G, Miranda MA, Esguevillas G, Torres MJ, et al. Gender and functional CYP2C and NAT2 polymorphisms determine the metabolic profile of metamizole. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(3):457-66.
- Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clin Pharmacokinet.* 1995;28(3):216-34.
- Lautenschlager MT, Viktor S, Müller UA, Hoffmann A. Comparison of serum concentrations of caffeine, 4-methylaminoantipyrine, sulfamethazine and debrisoquin following oral administration of these substances as a cocktail in type II diabetics before and after insulin therapy. *Pharmazie.* 1996;51(10):750-3.
- Wójcicki J, Wojciechowski G, Wójcicki M, Kostyrka R, Sterna R, Gawronska-Szklarz B, et al. Pharmacokinetics of propranolol and atenolol in patients after partial gastric resection: a comparative study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56(1):75-9.
- Salmerón-García A, Navas N, Martín A, Román E, Cabeza J, Capitán-Vallvey LF. Determination of tramadol, metamizole, ropivacaine, and bupivacaine in analgesic mixture samples by HPLC with DAD detection. *J Chromatogr Sci.* 2009;47(3):231-7.
- Ojha A, Rathod R, Padh H. Quantification of 4-methylaminoantipyrine, the active metabolite of dipyron, in human plasma. *Bioanalysis.* 2009;1(2):293-8.
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf – data wejścia: 20.12.2019.
- Goutal S, Auvity S, Legrand T, Hauquier F, Cisternino S, Chapy H, et al. Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arteriovenous concentration gradient. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;123:173-8.
- Naseef H, Moqadi R, Qurt M. Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Antidiabetic Drug Alogliptin Benzoate in Bulk and Tablets. *J Anal Methods Chem.* 2018;2018:1902510.
- Baranowska I, Markowski P, Baranowski J. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous analysis of 23 selected drugs belonging to different therapeutic groups in human urine samples. *Anal Sci.* 2009;25(11):1307-13.
- Zhuang Q, Pan R, Liu X, Xu W, Wang H, Zhang X, et al. A validated ultra-HPLC-MS/MS method for determination of honokiol in human plasma and its application to a clinical pharmacokinetic study. *Bioanalysis.* 2019;11(11):1085-98.
- <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> – data wejścia: 20.12.2020.
- Astolfi ML, Marconi E, Protano C, Vitali M, Schiavi E, Mastromarino P, et al. Optimization and validation of a fast digestion method for the determination of major and trace elements in breast milk by ICP-MS. *Anal Chim Acta.* 2018;1040:49-62.
- Elkady EF, Aboelwafa AA. Rapid bioanalytical LC-MS/MS method for the simultaneous determination of sofosbuvir and velpatasvir in human plasma-application to a pharmacokinetic study in Egyptian volunteers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018;1102-1103:116-24.
- Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm MF, et al. Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J.* 2007;21(10):2343-51.