



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแทนที่วิธี HPLC ด้วยวิธี multivariate calibration ในการ
วิเคราะห์ปริมาณยาในรูปแบบยาเตรียมและในตัวอย่างพลาสมา

โดย ดร. ชุติมา เพชรกระจำว และคณะ

15 มีนาคม พ.ศ.2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแทนที่วิธี HPLC ด้วยวิธี multivariate calibration ในการ
วิเคราะห์ปริมาณยาในรูปแบบยาเตรียมและในตัวอย่างพลาสมา

ผู้วิจัย

ดร. ชุตินา เพชรกระจำว

สังกัด

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาสำนักงาน ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยนี้ ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการและ เครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ประพิณ วิไลรัตน์ อาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และกรุณาให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ตลอดงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่เคยสั่งสอนบ่มเพาะความรู้ ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความร่วมมือด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณบิดามารดาผู้ให้ความรักและการเลี้ยงดูอย่างดี รวมถึงสนับสนุนด้านการศึกษาตลอดชีวิต ขอขอบคุณครอบครัวที่อบอุ่นซึ่งเป็นกำลังใจและสนับสนุนการทำงาน

ชุตินา เพชรกระจำง

16 มีนาคม 2554

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5280225

ชื่อโครงการ : การแทนที่วิธี HPLC ด้วยวิธี multivariate calibration ในการวิเคราะห์

ปริมาณยาในรูปแบบยาเตรียมและในตัวอย่างพลาสมา

ชื่อนักวิจัย : ดร. ชุตติมา เพชรกระจ่าง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : pycmt@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 16 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2554

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยูวีสเปกโตรโฟโตเมตริกแบบอาศัยคีโมเมตริก เพื่อใช้สำหรับหาปริมาณยาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ในไซรัปและพลาสมา ในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีเซ็นทรัลคอมโพสิทดีไซน์ (Central Composite Design, CCD) ในการออกแบบชุดสารละลายปรับเทียบ (Calibration mixtures) จากนั้นใช้ข้อมูลการดูดกลืนแสงยูวีของชุดสารละลายปรับเทียบไปใช้ในการสร้างแบบจำลองชนิดปรินซิเปิลคอมโพเนนต์เรกเรชันหรือพีซีอาร์ (principle component regression, PCR) และพาร์เชียลลีสแควร์ หรือ พีแอลเอสวัน (partial least square, PLS-1) เพื่อใช้หาปริมาณของโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ในตัวอย่างใหม่ (unknown samples) ชุดของสารละลายอีกชุดหนึ่งได้ถูกเตรียมขึ้นโดยวิธีสุ่มและใช้สำหรับประเมินแบบจำลอง แบบจำลองที่ผ่านการประเมินแล้วจะถูกใช้ในการหาปริมาณยาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ในไซรัป และพลาสมาที่เติมยาลงไป นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธีเอชพีแอลซี (HPLC) ขึ้นมาสองวิธีเพื่อใช้ในการหาปริมาณยาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ในไซรัปและพลาสมา เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธีการหาปริมาณโดยใช้แบบจำลอง โดยวิธีเอชพีแอลซีทั้งสอง ได้ถูกประเมินเช่นกัน และใช้ในการหาปริมาณยาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ในตัวอย่างไซรัปและพลาสมาที่เติมยาลงไป โดยที่ตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างชุดเดียวกับที่ผ่านการหาปริมาณโดยใช้แบบจำลองมาแล้ว ผลการวิจัยพบว่าการหาปริมาณยาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์โดยใช้แบบจำลองให้ผลที่เทียบเคียงกันได้ดีกับผลที่ได้จากวิธีเอชพีแอลซี ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีคีโมเมตริกสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทางเลือกสำหรับหาปริมาณยาในตำรับยาผสมหรือสารผสมได้

คำสำคัญ: คีโมเมตริก ปรินซิเปิลคอมโพเนนต์เรกเรชัน พีซีอาร์ พาร์เชียลลีสแควร์ พีแอลเอสวัน

Abstract

Project Code : MRG5280225

Project Title : Replacement of HPLC method with multivariate calibration method for quantitative determination of drugs in pharmaceutical dosage form and plasma sample

Investigator : Dr. Chutima Phechkrajang

E-mail Address : pycmt@mahidol.ac.th

Project Period : March 16, 2009 – March 15, 2011

In this study, chemometrics-assisted UV spectrophotometric methods for determination of lopinavir and ritonavir in syrup and plasma were developed. Calibration mixtures (calibration sets) were design by Central Composite Design (CCD). The resulting UV spectra of calibration sets were subjected to principle component regression (PCR) and partial least squares (PLS-1) regression to construct the prediction models for lopinavir and ritonavir in unknown samples. Sets of synthetic mixtures were randomly selected and used as samples to validate the models. The resulted models were used to analyse two drugs in syrup and drugs spiked plasma samples. Two HPLC methods for determination of lopinavir and ritonavir in syrup and plasma samples were also developed and validated. These HPLC procedures were used as standard methods for determination of intended drugs in the same syrup and plasma samples applied to chemometrics models. The determination results of PCR and PLS-1 models were compared with those obtained from HPLC methods. The comparison results showed that chemometrics method could comparable with HPLC procedure. These implied that chemometrics approach could be used as alternative method for determination of combined substances.

Keywords : Chemometrics, Principle component regression, PCR, Partial least square regression, PLS-1

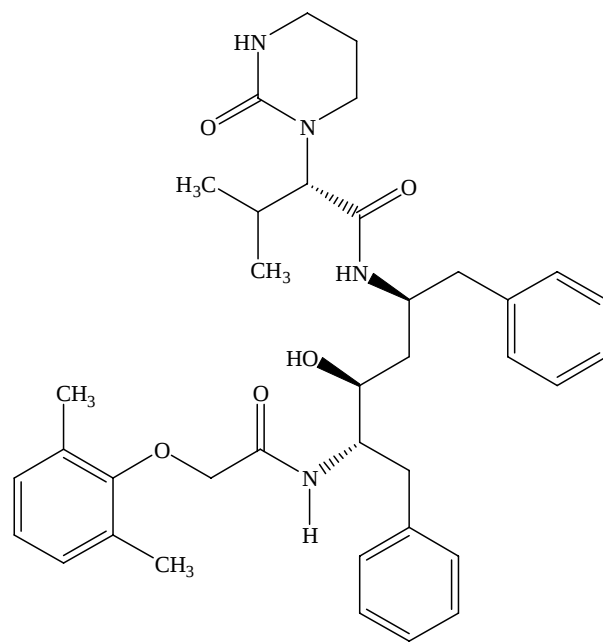
บทนำ

ยา lopinavir และ ritonavir (รูปที่ 1) เป็นยากลุ่ม protease inhibitor ทั้งสองเป็นยาสำคัญที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ HIV-1 โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease ของเชื้อไวรัสดังกล่าว ซึ่งเอนไซม์ protease เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส ยา lopinavir และ ritonavir ปัจจุบันถูกผลิตออกมาจำหน่ายในรูปยาผสมโดยบริษัท Abbott Laboratories ในชื่อการค้า Kaletra®

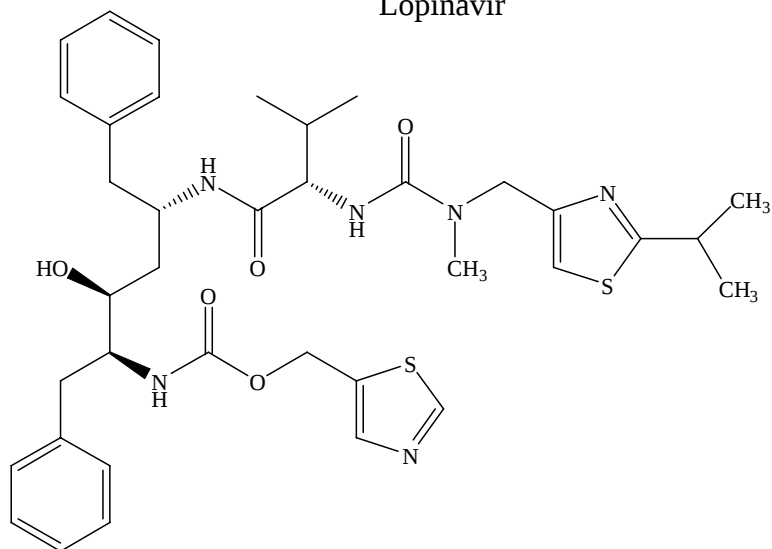
ยา lopinavir มีฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัสแรงกว่า ritonavir ประมาณ 10 เท่า แต่การใช้ในรูปยาผสมพบว่า ritonavir เป็นตัวที่ช่วยให้เภสัชจลนศาสตร์ของยาดีขึ้น [1]

การวิเคราะห์ปริมาณยาทั้งสองชนิดโดยทั่วไปจะใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) [2-4] ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ยาผสม นอกจากนี้ก็มีการใช้วิธี LC/MS [5-9], LC-MS/MS [10], matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF-TOF) [11], HPTLC [12] และวิธี immunoassay [13] การที่จะวิเคราะห์ยาผสมโดยใช้การวัดโดยตรงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยปกติไม่สามารถทำได้ เนื่องจากมีการซ้อนทับของ UV spectrum ของยา แต่ถ้านำวิธี chemometrics มาใช้ร่วมด้วยพบว่าสามารถช่วยแก้ปัญหาได้ในบางกรณี

วิธี chemometrics ได้ถูกนำเสนอครั้งแรกในปี 1972 โดย Svan Wold [14] วิธีเป็นการใช้สถิติและคณิตศาสตร์มาใช้ในการตอบคำถามหรือให้ข้อมูลใหม่ทางเคมีโดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานทางเคมีที่มีอยู่เดิม [15] Multivariate calibration เป็นวิธีทาง chemometrics ที่นิยมใช้ในการหาปริมาณสารผสมโดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานเช่นการดูดกลืนแสง UV ของสารผสม วิธี multivariate calibration ที่นิยมใช้คือ multiple linear regression (MLR), principle component regression (PCR) และ partial least square regression (PLS)



Lopinavir



Ritonavir

รูปที่ 1

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งเป็น 4 ส่วนหลักดังนี้

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในตำรับยาน้ำ โดยใช้ HPLC-UV พร้อมทั้งการประเมินวิธีวิเคราะห์ (method validation)
2. การสร้างแบบจำลองทางสถิติเพื่อใช้ในการหาปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในตำรับยาน้ำ
3. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในพลาสมา โดยใช้ HPLC-UV พร้อมทั้งการประเมินวิธีวิเคราะห์ (method validation)
4. การสร้างแบบจำลองทางสถิติเพื่อใช้ในการหาปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในพลาสมา

ส่วนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในตำรับยาน้ำ โดยใช้ HPLC-UV พร้อมทั้งการประเมินวิธีวิเคราะห์ (method validation)

1. เครื่องมือ

O HPLC model LC-10AD system (Shimadzu)

2. Standard preparation

เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 1 mg/mL ของยาทั้งสอง โดยเตรียมแยกกัน และเจือจางจากความเข้มข้นนี้ลงเป็น working standard solution ความเข้มข้น 0.1 mg/mL โดยใช้ 50% methanol ในการเจือจาง

3. Preparation of calibration curve

Calibration curve ใช้ยาทั้งสองที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 2, 6, 10, 14 และ 18 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.4, 1.4, 2.4, 3.4 และ 4.4 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir การเตรียมจะเตรียมในรูปของ standard mixture solution ของยาทั้งสอง โดยการเจือจางจาก stock standard solution ความเข้มข้น 1 mg/mL ใช้ 50% methanol ในการเจือจาง

4. Sample preparation

ตัวอย่างยาน้ำถูกนำมาเจือจางลง 10 เท่าด้วย methanol จากนั้น เจือจางลงอีก 10 เท่าด้วย 50% methanol ความเข้มข้นของยาที่เจือจางแล้วคือ lopinavir 8 $\mu\text{g/mL}$ และ ritonavir 2 $\mu\text{g/mL}$

5. Method development

ใช้ lopinavir ความเข้มข้น 32 $\mu\text{g/mL}$ และ ritonavir ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/mL}$ ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC-UV คอลัมน์ที่ใช้คือ BDS Hypersil C18 (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm) สิ่งที่ทำการศึกษาคือองค์ประกอบของ mobile phase ที่ทำให้เกิดการแยกของยาทั้งสองได้ดีและใช้เวลาน้อย องค์ประกอบของ mobile phase ที่ศึกษาคือ ชนิด

และความเข้มข้นของ organic solvent ชนิด ความเข้มข้น และ pH ของสารละลาย buffer โดยอัตราการไหลของ mobile phase ใช้ที่ 1 mL/min และ UV detector วัดที่ 254 nm

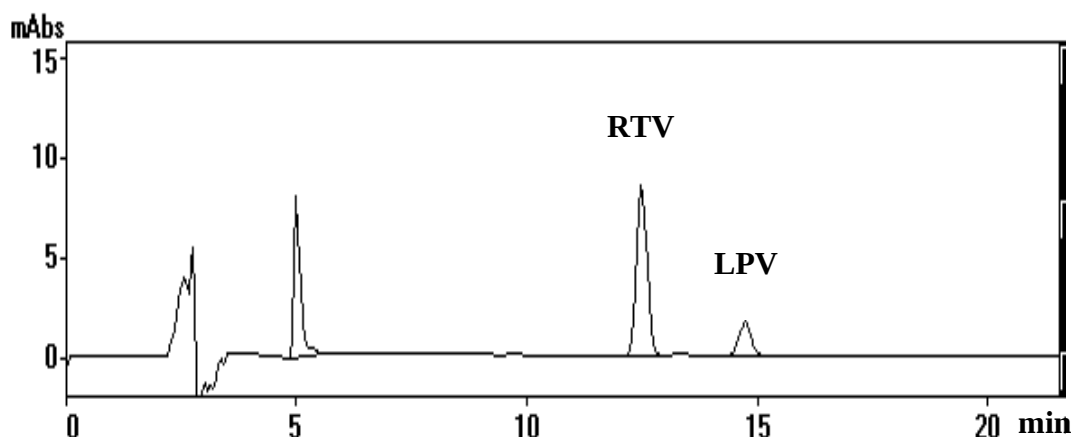
6. Validation of the method

การประเมินวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง รวมทั้งยืนยันความสามารถในการใช้งาน ทำการประเมินใน 5 ปัจจัยต่อไปนี้คือ

- a. Linearity
- b. Accuracy
- c. Precision
- d. Specificity
- e. Range

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา lopinavir และ ritonavir โดยใช้ HPLC-UV ในการศึกษาทำการเปรียบเทียบ organic solvent สองชนิด คือ methanol และ acetonitrile พบว่า organic solvent ที่เหมาะสมคือ acetonitrile ที่ระดับความเข้มข้น 50% ใน mobile phase สำหรับ buffer ที่เป็นส่วนผสมใน mobile phase ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง ammonium acetate และ potassium phosphate พบว่า ammonium acetate มีความเหมาะสมดีกว่าในแง่ของเวลาที่ใช้ในการแยก และ peak shape ของยา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ buffer จากการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 5-40 mM พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกยาทั้งสองคือ 5 mM และจากการศึกษา pH ของ buffer ในช่วง pH 3-8 พบว่า pH ที่เหมาะสมคือ pH 7 โดยสรุปผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้ พบว่าระบบ HPLC-UV ที่เหมาะสมในการแยกยา lopinavir และ ritonavir คือใช้ คอลัมน์ BDS Hypersil C18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 μ m) mobile phase คือ acetonitrile และ 5 mM ammonium acetate, pH 7 อัตราส่วนโดยปริมาตร 50:50 ใช้อัตราส่วนคงที่ อัตราการไหลใช้ที่ 1 mL/min และ UV detector วัดที่ 254 nm โดยอัตราการไหลและค่าของ UV detector คงที่ตลอดการทดลอง (รายละเอียดตามภาคผนวก 1) ค่า retention time ที่ได้จากระบบดังกล่าวคือ 12.5 นาที สำหรับ ritonavir และ 14.7 นาที สำหรับ lopinavir (รูปที่ 2)

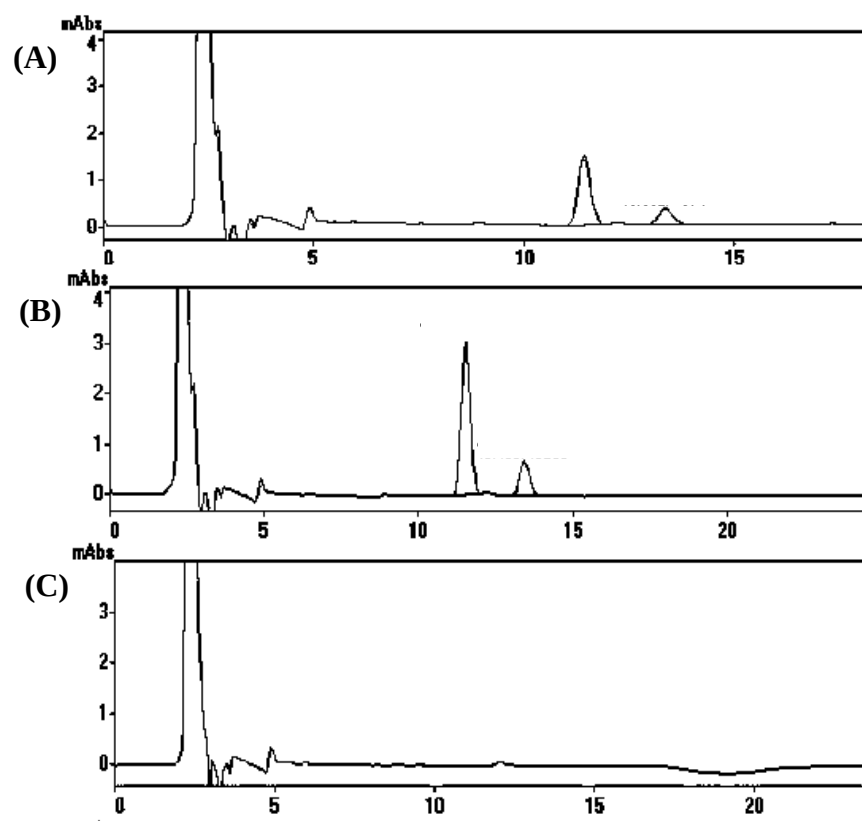


รูปที่ 2

การประเมินวิธี HPLC ข้างต้น ได้ผลดังนี้

- a. Linearity ผลการศึกษา linearity ของวิธี HPLC-UV ในช่วงความเข้มข้น 2-8 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.4-4 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir และประมวลผลโดยวิธี linear regression พบว่า ยาทั้งสองชนิดให้ค่าการวิเคราะห์ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นในลักษณะที่เป็นเส้นตรงได้ดี โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่า 0.999 สำหรับยาทั้งสองชนิด แสดงให้เห็นว่าวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้น มีความเหมาะสมที่จะใช้หาปริมาณยาทั้งสองในช่วงที่ระบุ
- b. Accuracy ความถูกต้องของวิธี ประเมินโดยการทำ standard addition และหาความถูกต้องจากการคำนวณเป็นค่าการกลับคืน (% recovery) ในช่วงความเข้มข้น 2-8 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.4-4 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir ผลการประเมินพบว่า % recovery สำหรับ lopinavir ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว อยู่ระหว่าง 98.9-99.9% และ % recovery สำหรับ ritonavir ในช่วงความเข้มข้น 0.4-4.4 $\mu\text{g/mL}$ อยู่ระหว่าง 98.8-100.5%
- c. Precision เป็นการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจสอบความสามารถที่จะให้ค่าการวิเคราะห์ที่คงที่ในกรณีที่มีวิเคราะห์ซ้ำ การประเมินนี้จะดูที่ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, %RSD) ของผลวิเคราะห์ที่ได้จากการทำซ้ำ โดยการทดลองทำซ้ำ จะแบ่งเป็นการทำซ้ำภายใน 1 วัน (intra-day) และการทำซ้ำต่างวัน (inter-day) ผลการประเมินพบว่าค่า %RSD ของ intra-day และ inter-day precision น้อยกว่า 2 % ทั้งสองตัวยา โดยความเข้มข้นที่ศึกษาเป็นช่วงเดียวกับการศึกษา linearity และ accuracy แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้นในการที่จะใช้วิเคราะห์ตัวยาทั้งสองในช่วงที่ระบุ

- d. Specificity เป็นการประเมินวิธีวิเคราะห์ในแง่ของการมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารหรือตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์ รวมทั้งความสามารถให้การแยก (selective) สารหรือตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์จากสารอื่นๆที่อาจพบได้ในตัวอย่าง การประเมินทำโดยการเปรียบเทียบระหว่าง chromatogram ของยาน้ำที่มีตัวยาสำคัญทั้งสอง ยาพื้นของยาน้ำหรือยาน้ำที่ไม่มีตัวยาสำคัญทั้งสอง (syrup blank) และ chromatogram ของยาน้ำที่มีตัวยาสำคัญทั้งสองที่มีการเติมตัวยาทั้งสองเพิ่มลงไป 100% (รูปที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบ chromatogram ทั้งสามพบว่า ที่ตำแหน่ง retention time ของยาทั้งสอง ไม่ปรากฏ peak ของสารใดที่มาจากยาพื้นของตำรับยาน้ำ (3C) แสดงว่าไม่มีการรบกวน หรือ interfere ผลการวิเคราะห์จากสารอื่นที่มีในตำรับยา และเมื่อประเมินจากค่า peak area ของ chromatogram ระหว่างยาน้ำ (3A) กับยาน้ำที่เติมตัวยาทั้งสองเพิ่มลงไป 100% (3B) พบว่า ค่า peak area เพิ่มเป็นสองเท่า สอดคล้องกับความเข้มข้นของตัวยาที่เพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวแสดงควมมี specificity ของวิธีที่พัฒนาขึ้นต่อตัวยาทั้งสอง



รูปที่ 3

- e. Range ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับตัวยา lopinavir และ ritonavir ที่สามารถวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้น แล้วให้ค่าความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง ความแม่นยำ ที่ยอมรับได้ ใช้การประเมินจากผลการศึกษา linearity

accuracy และ precision พบว่า range หรือช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับตัวยา lopinavir คือ 2-8 $\mu\text{g/mL}$ และ ritonavir คือ 0.4-4.4 $\mu\text{g/mL}$

ส่วนที่ 2 การสร้างแบบจำลองทางสถิติเพื่อใช้ในการหาปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในตำรับยาน้ำ

เป็นการสร้างแบบจำลอง หรือพัฒนาวิธีทาง chemometrics โดยสถิติที่ใช้คือ multivariate calibration ชนิด principle component regression (PCR) และ partial least square (PLS-1) ผลที่ได้จากการทดลองในส่วนนี้คือ แบบจำลองทางสถิติชนิด PCR และ PLS-1 เพื่อใช้ในการหาปริมาณ lopinavir และ ritonavir ในยาน้ำ

1. เครื่องมือ

O Shimadzu (UV-160A) UV-Vis spectrophotometer

2. การเตรียมสารเคมี

เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 1 mg/mL ของยาทั้งสอง โดยเตรียมแยกกัน และทำละลายด้วย methanol ส่วน working solution ที่ความเข้มข้นน้อยลง เตรียมโดยการเจือจางจาก stock standard solution จนกระทั่งได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และใช้ 50% methanol ในการเจือจาง สำหรับตัวอย่างยาน้ำ ทำการเจือจางด้วย methanol จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ lopinavir 8 $\mu\text{g/mL}$ และ ritonavir 2 $\mu\text{g/mL}$ ยาพื้นของตำรับยาน้ำ (syrup blank, ยาน้ำที่ไม่มีตัวยาสำคัญ) เตรียมเป็น working solution โดยการเจือจาง syrup blank ลง 100 เท่าด้วย methanol

3. One component calibration

เป็นการหาช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละชนิด ที่จะให้การตอบสนองต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง (linear dynamic concentration range) ทำการศึกษาในช่วง 4-24 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 1-6 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง λ_{max} คือ 259 nm สำหรับ lopinavir และ 239 nm สำหรับ ritonavir นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน x) และ ค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) ดูลักษณะการตอบสนองที่เป็นเส้นตรง จากค่า correlation coefficient (r^2) ที่ได้จากการสมการ least square linear regression ของข้อมูล

4. Binary standard solution

เป็นการเตรียมชุดของสารละลาย 2 ชุด คือ calibration set และ test set ใน calibration set จะมีสารละลายอยู่ 20 สารละลาย แต่ละสารละลายเป็นสารละลายผสมของยา lopinavir และ ritonavir และจะมีความเข้มข้นของยา lopinavir และ ritonavir แตกต่างกัน ความเข้มข้นของยาในแต่ละสารละลายได้มาจากการคำนวณโดยวิธี central composite design (CCD) เมื่อทราบความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จึงทำการเตรียมสารละลายแต่ความเข้มข้นจากการเจือจางจาก stock standard solution ของยาแต่ละ

ชนิด ความเข้มข้นของยาใน calibration set จะต้องไม่เกินช่วงที่เป็น linear dynamic concentration range ของยาแต่ละชนิด calibration set เป็นชุดของสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสร้างแบบจำลอง หรือ calibration step ส่วน test set เป็นชุดของสารละลายอีกชุดหนึ่งที่ไม่ถูกใช้ หรือเกี่ยวข้อใน calibration step เอาไว้สำหรับการทดสอบแบบจำลองที่ได้มาจากขั้นตอนแรก หรือ calibration step ความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดในแต่ละสารละลายถูกกำหนดโดยอิสระ (randomly selection) แต่ต้องไม่เกินช่วง linear dynamic concentration range ของยาแต่ละชนิด ในการทดลองนี้ test set มีสารละลายทั้งหมด 15 สารละลาย

5. Models building นำค่าการดูดกลืนแสงของ calibration set ไปสร้างแบบจำลองชนิด PCR และ PLS-1 โดยใช้โปรแกรม Unscrambler[®]

โปรแกรมที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองชนิด multivariate calibration ในปัจจุบันมีหลายโปรแกรมเช่น Multivar, MVC1 และ Unscrambler[®] ซึ่งผลการเปรียบเทียบการใช้งานพบว่า MVC1 เป็นโปรแกรมที่ต้องใช้คู่กับโปรแกรม Matlab ซึ่งมีคำสั่งเฉพาะของโปรแกรม ไม่เหมาะสำหรับผู้ใช้งานทั่วไป ส่วน Multivar ให้ผลที่ไม่ต่างจาก Unscrambler[®] มากนัก แต่ Multivar เป็นโปรแกรมที่ต้องเตรียมข้อมูลในรูปแบบที่จำเพาะของโปรแกรมและไม่รองรับ file ข้อมูล excel ที่มีข้อมูลของสารละลายมากกว่า 1 สารละลาย ทำให้มีความยุ่งยากในการใช้งานโดยเฉพาะกรณีที่มีจำนวนสารละลายมากใน calibration set และ test set การทดลองในส่วนนี้จึงเลือกใช้โปรแกรม Unscrambler[®] เพียงชนิดเดียว (การเปรียบเทียบผลระหว่างโปรแกรมมีอยู่ในภาคผนวก 3)

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การทำ one component calibration เพื่อหาช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรง หรือ linear dynamic concentration range พบว่าช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 4-24 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 1-6 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir มีความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสง โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่า 0.999 (รูปที่ 4) และเพื่อหลีกเลี่ยงการดูดกลืนแสงที่สูงเกินไปในสารละลายผสม จึงกำหนดค่าสูงสุดของ lopinavir ใน calibration set เป็น 16 $\mu\text{g/mL}$ และสำหรับ ritonavir จะใช้ไม่เกิน 4 $\mu\text{g/mL}$ ค่าความเข้มข้นของยาทั้งสองในแต่ละชุดของสารละลายแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ในที่นี้จะทำการเติม working solution ของยาพื้น (placebo stock solution) ลงในแต่ละสารละลายด้วย เนื่องจากองค์ประกอบในยาพื้นสามารถดูดกลืนแสงได้บางส่วน นำค่าการดูดกลืนแสงของ calibration set ไปทำการสร้าง PCR และ PLS-1 models โดยใช้โปรแกรม Unscrambler[®] จากนั้น PCR และ PLS-1 models ที่สร้างขึ้นได้นำไปใช้หาปริมาณยาทั้งสองใน test set และพบว่า models ดังกล่าวสามารถใช้ในการหาปริมาณยาทั้งสองได้ดีเมื่อทำการทดสอบโดยใช้ test set และแสดงเป็นค่าการกลับคืน (%)

recovery) ระหว่างความเข้มข้นที่มีอยู่จริงกับค่าที่หาได้โดยใช้ model และได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการหาปริมาณยาในตัวอย่างยาในตัวของ PCR, PLS-1 models กับ HPLC method ที่ได้จากการพัฒนาในส่วนที่ 1 พบว่าค่าที่ได้จาก models ใกล้เคียงกับค่าที่ได้โดยใช้ HPLC (รายละเอียดตามภาคผนวก 2)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของยาใน calibration set

Sample	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)		Volume of placebo stock solution (μL)
	Lopinavir	Ritonavir	
1	0.00	2.00	100
2	16.00	2.00	100
3	8.00	0.00	100
4	8.00	4.00	100
5	2.30	0.60	100
6	13.60	0.60	100
7	13.60	3.40	100
8	2.30	3.40	100
9	8.00	2.00	100
10	8.00	2.00	100
11	8.00	2.00	100
12	8.00	2.00	100
13	8.00	2.00	100
14	8.00	2.00	100
15	8.00	2.00	100
16	8.00	2.00	100
17	0.00	0.00	100
18	0.00	0.00	100
19	0.00	0.00	100
20	0.00	0.00	100

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของยาใน test set

Sample	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)		Volume of placebo stock solution (μL)
	Lopinavir	Ritonavir	
1	4.00	1.00	100
2	7.00	1.75	100
3	8.00	2.00	100
4	9.00	2.50	100
5	12.00	3.00	100
6	10.00	0.60	100
7	12.00	1.00	100
8	4.00	3.00	100
9	2.40	2.00	100
10	15.00	1.50	100
11	7.00	3.75	100
12	6.00	2.50	100
13	8.00	1.75	100
14	13.00	0.75	100
15	3.00	3.15	100

ส่วนที่ 3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในพลาสมา โดยใช้ HPLC-UV พร้อมทั้งการประเมินวิธีวิเคราะห์ (method validation)

1. เครื่องมือ

O HPLC model LC-10AD system (Shimadzu)

2. Preparation of plasma sample

การเตรียมตัวอย่างพลาสมา เริ่มจากการหาวิธีการสกัดยาจากพลาสมาด้วย organic solvent ที่เหมาะสมเพื่อสกัดยาทั้งสองชนิดออกจากพลาสมา ให้มากที่สุดโดยที่สกัดสารอื่นที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด การศึกษาขั้นตอนนี้จะทำการเติมสารมาตรฐานของยาแต่ละชนิดลงไป blank plasma (blank plasma ดังกล่าว เป็นพลาสมาที่หมดอายุสำหรับการใช้งานทางคลินิกแล้ว แต่ยังคงมีส่วนประกอบที่เป็นประโยชน์สามารถใช้ในทางการศึกษาและการวิจัยได้ blank plasma ทั้งหมดที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ได้รับ

ความอ่อนแอจากโรงพยาบาลรามาริบัติ รูปแบบที่ได้รับมาคือการรวบรวมมาเป็นตัวอย่างเดียว (pooled plasma) และได้ขอการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนแล้ว) ให้มีความเข้มข้นของยา lopinavir เป็น 48 $\mu\text{g/mL}$ และ ritonavir เป็น 24 $\mu\text{g/mL}$ โดยเตรียมแยกกัน จากนั้นการสกัดจะใช้พลาสมา (ที่เติมยาลงไปแล้ว) ปริมาตร 500 μL สกัดด้วย organic solvent ชนิดต่างๆ ทำการสกัด 2 ครั้ง ใช้ organic solvent ครั้งละ 4 mL จากนั้นทำการ centrifuge เพื่อแยกชั้น organic solvent เก็บรวมระเหยแห้ง ทำละลายใหม่ด้วย 50% methanol 2 mL กรองด้วย nylon membrane ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4. Development of HPLC method

ใช้คอลัมน์ BDS Hypersil Gold C18 (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm) mobile phase เริ่มต้นที่ใช้คือ acetonitrile และ 50 mM ammonium acetate, pH 7 อัตราส่วนโดยปริมาตร 40:60 ใช้อัตราส่วนคงที่ อัตราการไหลใช้ที่ 1 mL/min และ UV detector วัดที่ 254 nm โดยอัตราการไหลและค่าของ UV detector คงที่ตลอดการทดลอง และมีปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของตามผลการทดลองจนได้ระบบ mobile phase ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ยา lopinavir และ ritonavir ในพลาสมา

5. Validation of HPLC method

การประเมินวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง รวมทั้งยืนยันความสามารถในการใช้งาน ทำการประเมินใน 5 ปัจจัยต่อไปนี้คือ

- Linearity
- Accuracy
- Precision
- Specificity
- Range

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การศึกษาหาชนิดของ organic solvent ที่เหมาะสมเพื่อใช้สกัดยาทั้งสองชนิดจากตัวอย่างพลาสมา ทำการศึกษาทั้งหมด 6 สภาวะดังตารางที่ ผลการศึกษาพบว่า ส่วนผสมของ hexane และ ethylacetate อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ให้ผลในการสกัดดีที่สุด โดยแสดงผลในรูปของ % recovery ระหว่างยาที่ผ่านการสกัดกับยาที่ไม่ผ่านการสกัด organic solvent ระบบนี้จะใช้ในการศึกษาต่อไป สำหรับระบบ HPLC หลังจากที่ทำการศึกษาปรับเปลี่ยนองค์ประกอบใน mobile phase แล้ว สุดท้ายได้ระบบ mobile phase ที่เหมาะสมคือ acetonitrile และ 25 mM ammonium acetate, pH 7 อัตราส่วนโดยปริมาตร 50:50 และมี indinavir (2 $\mu\text{g/mL}$) เป็น internal standard การประเมินวิธีวิเคราะห์ (Validation of HPLC method) ได้ผลดังนี้

- Accuracy ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ทำการศึกษาแบบ standard addition ในช่วงความเข้มข้น 3-18 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ

0.75-7 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir แสดงผลในรูปของร้อยละการกลับคืนของยา (% recovery) ผลการศึกษาพบว่าได้ค่าการกลับคืนของยาใกล้เคียง 100 % (ตารางที่ 3 และ 4) แสดงถึงความถูกต้องของวิธี

- b. Precision ความแม่นยำของวิธีในการวิเคราะห์ซ้ำ ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 3-18 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.75-7 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir แสดงผลในรูปของความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, % RSD) ของการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ในวันเดียวกัน และต่างวัน ได้ผลดังตารางที่ 3-6 ผลการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมดได้ค่า %RSD ต่ำกว่า 4% ยกเว้นค่า %RSD ของ ritonavir ที่ระดับ 0.75 $\mu\text{g/mL}$ ผลดังกล่าวแสดงถึงความแม่นยำของวิธีที่ให้ผลคงที่
- c. Linearity ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 2-20 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.5-8 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir ผลการศึกษาพบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ค่าการวัดที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่า 0.99 สำหรับทั้งสองตัวยา
- d. Specificity ความจำเพาะของวิธีแสดงโดยการเปรียบเทียบ chromatogram ของ สารมาตรฐานของยากับ chromatogram ของ blank plasma (รูปที่ 4) ผลการเปรียบเทียบพบว่าตำแหน่งเวลาที่ยาแต่ละชนิดถูก elute ออกมาไม่ซ้อนทับกับสารใดๆ ในพลาสมา แสดงให้เห็นว่าระบบการวิเคราะห์นี้ไม่มีการ interfere การวิเคราะห์สารที่ต้องการจากสารอื่น
- e. Range ค่าสูงสุดและต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ยาทั้งโดยให้ค่า ความถูกต้อง ความแม่นยำ การตอบสนองที่เป็นเส้นตรงระหว่างค่าการวัดกับความเข้มข้น ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ทำการประเมินจากผลการศึกษา accuracy precision และ linearity พบว่า range ของวิธีนี้คือ 3 -18 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.75-7 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir

ตารางที่ 3 ผลการประเมินค่า accuracy และ intra-day precision ของวิธี HPLC ที่ใช้หาปริมาณยา lopinavir ในพลาสมา

Concentration					
3 $\mu\text{g mL}^{-1}$		10 $\mu\text{g mL}^{-1}$		18 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Sample No.	% recovery	Sample No.	% recovery	Sample No.	% recovery
1	105.71	1	105.03	1	101.73
2	105.53	2	102.63	2	99.22
3	99.24	3	102.15	3	101.31
4	105.10	4	102.90	4	99.90
5	104.75	5	99.54	5	98.31
SD	2.72	SD	1.96	SD	1.43
AVE	104.07	AVE	102.45	AVE	100.10
%RSD	2.62	%RSD	1.92	%RSD	1.43

ตารางที่ 4 ผลการประเมินค่า accuracy และ intra-day precision ของวิธี HPLC ที่ใช้หาปริมาณยา ritonavir ในพลาสมา

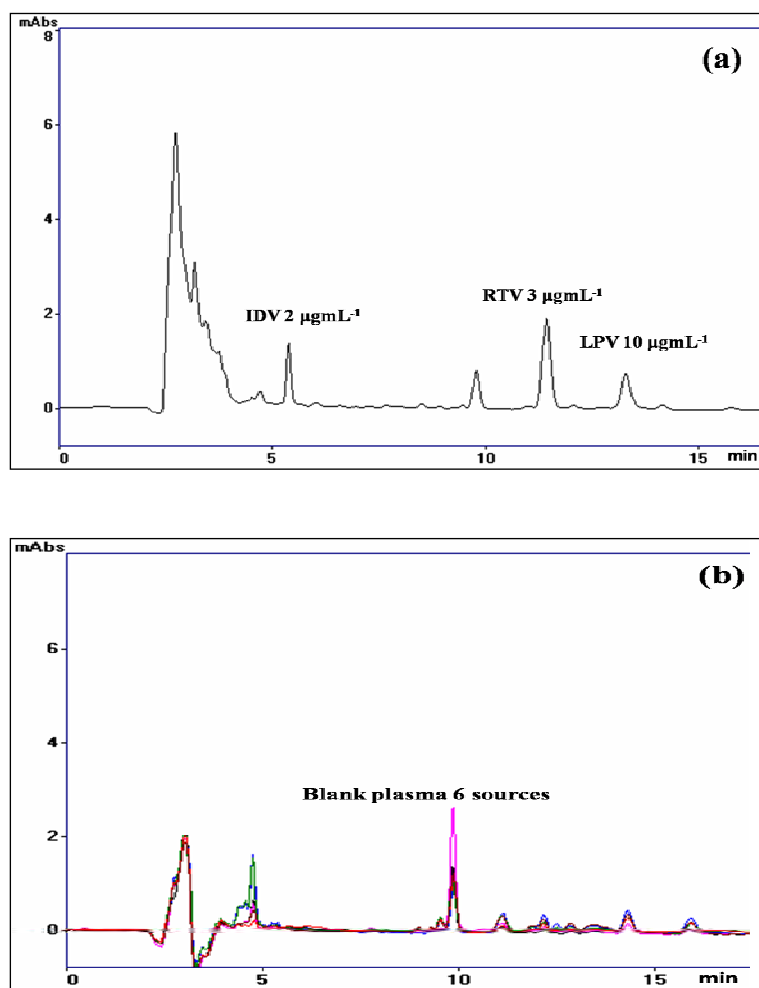
Concentration					
0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$		3 $\mu\text{g mL}^{-1}$		7 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Sample No.	% recovery	Sample No.	% recovery	Sample No.	% recovery
1	86.87	1	104.31	1	95.95
2	85.48	2	100.59	2	93.80
3	86.05	3	101.51	3	99.84
4	85.25	4	104.66	4	93.42
5	86.01	5	96.21	5	93.81
SD	0.63	SD	3.42	SD	2.70
AVE	85.93	AVE	101.46	AVE	95.37
%RSD	0.73	%RSD	3.37	%RSD	2.83

ตารางที่ 5 ผลการประเมินค่า inter-day precision ของวิธี HPLC ที่ใช้หาปริมาณยา lopinavir ในพลาสมา

Concentration					
3 $\mu\text{g mL}^{-1}$		10 $\mu\text{g mL}^{-1}$		18 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Day	% recovery	Day	% recovery	Day	% recovery
1	104.07	1	102.45	1	100.10
2	112.68	2	105.82	2	102.29
3	107.16	3	106.83	3	99.76
4	112.83	4	101.79	4	97.39
5	113.86	5	105.22	5	104.05
SD	4.28	SD	2.19	SD	2.55
AVE	110.12	AVE	104.42	AVE	100.72
%RSD	3.89	%RSD	2.10	%RSD	2.53

ตารางที่ 6 ผลการประเมินค่า inter-day precision ของวิธี HPLC ที่ใช้หาปริมาณยา ritonavir ในพลาสมา

Concentration					
0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$		3 $\mu\text{g mL}^{-1}$		7 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Day	% recovery	Day	% recovery	Day	% recovery
1	85.93	1	101.46	1	95.37
2	94.70	2	109.38	2	97.80
3	97.74	3	106.32	3	95.70
4	88.67	4	99.62	4	96.33
5	104.61	5	103.71	5	100.19
SD	7.42	SD	3.87	SD	1.97
AVE	94.33	AVE	104.10	AVE	97.08
%RSD	7.86	%RSD	3.72	%RSD	2.03



รูปที่ 4

ส่วนที่ 4 การสร้างแบบจำลองทางสถิติเพื่อใช้ในการหาปริมาณยา lopinavir และ ritonavir ในพลาสมา

เป็นการสร้างแบบจำลอง หรือพัฒนาวิธีทาง chemometrics โดยสถิติที่ใช้คือ multivariate calibration ชนิด principle component regression (PCR) และ partial least square (PLS-1) ผลที่ได้จากการทดลองในส่วนนี้คือ แบบจำลองทางสถิติชนิด PCR และ PLS-1 เพื่อใช้ในการหาปริมาณ lopinavir และ ritonavir ในพลาสมา

1. เครื่องมือ

- PerkinElmer (Lampda 35) UV-Visible spectrophotometer
- HPLC model LC-10AD system (Shimadzu)

2. การเตรียมสารเคมี

เตรียม stock solutions ของ lopinavir (ความเข้มข้น 1 mg/mL) และ ritonavir (0.5 mg/mL) โดยการละลายสารมาตรฐานของยาแต่ละชนิดใน methanol และใช้ stock

solutions ความเข้มข้นนี้ ในการเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำลงโดยการเจือจางด้วย 50% methanol

3. การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

ตัวอย่างพลาสมาถูกเตรียมโดยการเติมสารละลายผสมของสารมาตรฐาน ในแต่ละความเข้มข้นที่ต้องการ 100 μL ลงใน blank plasma ที่ไม่มีตัวยา 400 μL นำพลาสมาที่ผสมยาแล้ว มาสกัดด้วยส่วนผสมของ hexane:ethylacetate (1:1, v/v) จำนวน 2 mL ทำการสกัด จากนั้นแยกชั้นของ organic solvent ออกมา ระเหยแห้ง แล้วละลายใหม่ด้วย 50% methanol จำนวน 2 mL กรองด้วย nylon membrane ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ตัวยาในตัวอย่างพลาสมาถูกเจือจางลง 4 เท่า)

4. One component calibration

เป็นการหาช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละชนิด ที่จะให้การตอบสนองต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง (linear dynamic concentration range) ทำการศึกษาในช่วง 1-24 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 0.5-6 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง λ_{max} คือ 259 nm สำหรับ lopinavir และ 239 nm สำหรับ ritonavir นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน x) และ ค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) คุณลักษณะการตอบสนองที่เป็นเส้นตรง จากค่า correlation coefficient (r^2) ที่ได้จากการสมการ least square linear regression ของข้อมูล

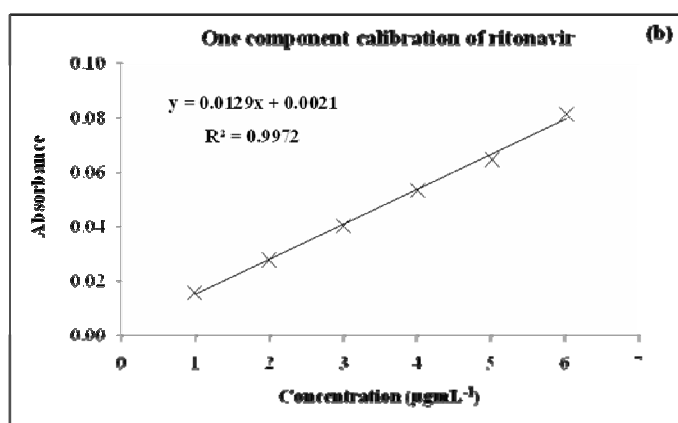
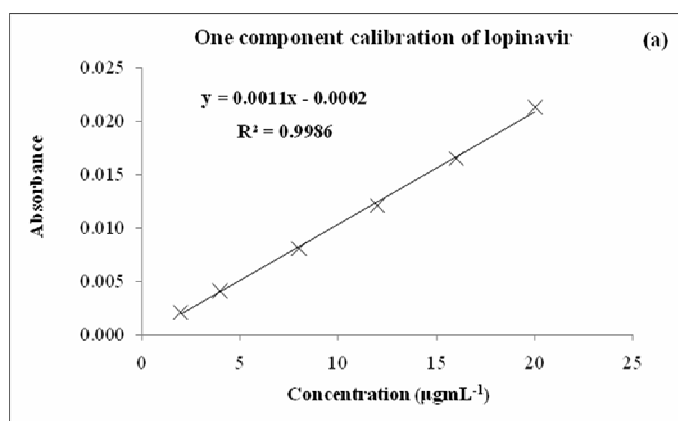
5. Binary standard solution

เป็นการเตรียมชุดของสารละลาย 2 ชุด คือ calibration set และ test set ใน calibration set จะมีสารละลายอยู่ 20 สารละลาย แต่ละสารละลายเป็นสารละลายผสมของยา lopinavir และ ritonavir และจะมีความเข้มข้นของยา lopinavir และ ritonavir แตกต่างกัน ความเข้มข้นของยาในแต่ละสารละลายได้มาจากการคำนวณโดยวิธี central composite design (CCD) เมื่อทราบความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จึงทำการเตรียมสารละลายแต่ละความเข้มข้นจากการเจือจางจาก stock standard solution ของยาแต่ละชนิด เจือจางลงทำเป็นสารละลายผสมแล้วใช้ 100 μL ของสารละลายผสมเติมลงใน blank plasma 400 μL ความเข้มข้นของยาในตัวอย่างพลาสมาเป็นไปตามที่กำหนดไว้ใน calibration set ความเข้มข้นของยาใน calibration set จะต้องไม่เกินช่วงที่เป็น linear dynamic concentration range ของยาแต่ละชนิด calibration set เป็นชุดของสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสร้างแบบจำลอง หรือ calibration step ส่วน test set เป็นชุดของสารละลายอีกชุดหนึ่งที่ไม่ถูกใช้ หรือเกี่ยวข้องใน calibration step เอาไว้สำหรับการทดสอบแบบจำลองที่ได้มาจากระบบต้นแบบ หรือ calibration step ความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดในแต่ละสารละลายถูกกำหนดโดยอิสระ (randomly selection) แต่ต้องไม่เกินช่วง linear dynamic concentration range ของยาแต่ละชนิด ในการทดลองนี้ test set มีสารละลายทั้งหมด 10 สารละลาย

6. Models building นำค่าการดูดกลืนแสงของ calibration set ไปสร้างแบบจำลองชนิด PCR และ PLS-1 โดยใช้โปรแกรม Unscrambler[®]

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การทำ one component calibration เพื่อหาช่วงการตอบสนองที่เป็นเส้นตรง หรือ linear dynamic concentration range พบว่าช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 4-24 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ lopinavir และ 1-6 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ ritonavir มีความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสง โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่า 0.99 (รูปที่ 5a และ b) และเพื่อหลีกเลี่ยงการดูดกลืนแสงที่สูงเกินไปในสารละลายผสม จึงกำหนดค่าสูงสุดของ lopinavir ใน calibration set เป็น 16 $\mu\text{g/mL}$ และสำหรับ ritonavir จะใช้ไม่เกิน 4 $\mu\text{g/mL}$ ค่าความเข้มข้นของยาทั้งสองในแต่ละชุดของสารละลายแสดงในตารางที่ และ ในที่นี้จะทำการเติม blank plasma ลงในแต่ละสารละลายด้วย เนื่องจากส่วนประกอบในพลาสมาเช่น plasma proteins สามารถดูดกลืนแสงได้บางส่วน เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของ calibration set ไปทำการสร้าง PCR และ PLS-1 models โดยใช้โปรแกรม Unscrambler[®] พบว่า models ที่เหมาะสมมีค่า parameters ต่างๆดังแสดงในตารางที่ โดยที่ PCR และ PLS-1 models ที่เหมาะสมนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณยาทั้งสองได้ดีเมื่อทำการทดสอบโดยใช้ test set และแสดงเป็นค่าการกลับคืน (% recovery) ระหว่างความเข้มข้นที่มีอยู่จริงกับค่าที่หาได้โดยใช้ model จากนั้นทำการเปรียบเทียบความสามารถในการหาปริมาณยาในตัวอย่างพลาสมาของ PCR, PLS-1 models กับ HPLC method ที่ได้จากการพัฒนาในส่วนที่ 3 พบว่าค่าที่ได้จาก models ใกล้เคียงกับค่าที่ได้โดยใช้ HPLC (รายละเอียดตามภาคผนวก 3)



รูปที่ 5

เอกสารอ้างอิง

1. Dickinson L., Robinson L., Tjia J., Khoo S., Back D., Simultaneous determination of HIV protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J Chromatogr B.*, 2005, 829, 82-90.
2. Albert V., Modamino P., Lastra C.F., Mariño E.L., Determination of saquinavir and ritonavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography and the analytical error function., *J Pharm Biomed Anal.*, 2004, 36, 835-840.
3. Notari S., Bocedi A., Ippilito G., Narciso P., Pucillo L.P., Tossini G., Donnorso R.P., Gasparri F., Ascenzi P., Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography., *J Chromatogr B.*, 2006a, 831, 258-266.
4. Rebiere H., Mazel B., Civade C., Bonnet P.A., Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography., *J Chromatogr B.*, 2007, 850, 376-383.
5. Colombo S., Beguin A., Telenti A., Biollaz J., Buclin T., Rochat B., Decosterd L.A., Intracellular measurements of anti-HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir, efavirenz and nevirapine in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B.*, 2005, 819, 256-276.
6. D'Avolio A., Siccardi M., Sciandra M., Lorena B., Bonora S., Trentini L., Perri G.D., HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease

inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients., *J Chromatogr B.*, 2007, 859, 234-240.

7. DiFrancesco R., DiCenzo R., Vicente G., Donnelly J., Martin T.M., Colon L.A., Schifito G., Morse G.D., Determination of lopinavir cerebral spinal fluid and plasma ultrafiltrate concentrations by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry., *J Pharm Biomed Anal.*, 2007, 44, 1139-1146.
8. ter Heine R., Rosing H., van Gorp E.C.M., Mulder J.W., van der Steeg W.A., Beijnen J.H., Huitema A.D.R., Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry., *J Chromatogr B.*, 2008, 867, 205-212.
9. Temghare G.A., Shetye S.S., Joshi S.S., Rapid and sensitive method for quantitative determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *E-J.Chem.*, 2009, 6(1), 223-230.
10. Ehrhardt M., Möck M., Haefeli W.E., Mikus G., Burhenne J., Monitoring of lopinavir and ritonavir in peripheral blood mononuclear cells, plasma, and ultrafiltrate using a selective and highly sensitive LC/MS/MS assay., *J Chromatogr B.*, 2007, 850, 249-258.
11. Notari S., Mancone C., Tripodi M., Narciso P., Fasano M., Ascenzi P., Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF., *J Chromatogr B.*, 2006b, 833, 109-116.

12. Sulebhavikar A.V., Pawar U.D., Mangoankar K.V., Prabhu-Navelkar N.D., HPTLC methods for simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in capsule dosage form., *E-J. Chem.*, 2008, 5(4), 706-712.
13. Azoulay S., Nevers M.C., Créminon C., Heripret L., Garraffo R., Durant J., Dellamonica P., Grassi J., Guedj R., Duval D., An enzyme immunoassay for the quantification of plasma and intracellular lopinavir in HIV-infected patients., *J Immunol Methods.*, 2004, 295, 37-48.
14. Lavine B., Workman J., Chemometrics., *Anal Chem.*, 2008, 80, 4519-4531.
15. Einax J.W., Chemometrics in analytical chemistry., *Anal Bioanal Chem.*, 2008, 390, 1225-1226.
16. Dinte E., Tomuta I., MUT E.M., Iovanov R.I., Leucuta S.E., Chemometric methods for the simultaneous assay of chloramphenicol, chlorhexidine and metronidazole during *in vitro* dissolution of drugs from mucoadhesive buccal gels., *FARMACIA.*, 2010, 58(5), 572-582.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ
 - มีผลงานที่ส่งไปแล้วเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร FARMACIA (ภาคผนวก 2)
 - มีผลงานที่เตรียมเสร็จแล้ว กำลังจะส่งตีพิมพ์ (ภาคผนวก 3)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาและอาหารในขั้นตอนการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งจะประหยัดและสะดวกกว่าการใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมีแบบเดิมที่ใช้อยู่
 - เชิงวิชาการ องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้สามารถถ่ายทอดให้นักศึกษา โดยเฉพาะระดับปริญญาโทและเอก ทำให้นักศึกษามีความรู้เรื่องเทคนิคการวิเคราะห์ใหม่ที่มีความทันสมัย
3. อื่นๆ
 - มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศแล้ว 1 ผลงาน (ภาคผนวก 1)

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

Quantitative Determination of Lopinavir and Ritonavir in Syrup Preparation by Liquid Chromatography

C. M. Phechkrajang^{1,2*}, E.E. Thin¹, L. Sratthaphut³, D. Nacapricha^{2,4} and P. Wilairat^{2,4}

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

²Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (First Labs)

³Department of Health-Related Informatics, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University,

Nakornpathom Campus. ⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Abstract

A simple high-performance liquid chromatographic method (HPLC) was developed for the simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in syrup. A reversed-phase with isocratic elution was utilized. The mobile phase was a mixture of 10 mM ammonium acetate, pH 7 and acetonitrile (50:50, v/v). The flow rate was operated at 1 ml/min and the presence of two interest compounds was detected by a UV detector at 245 nm. The retention times on the described method were about 12.5 min and 14.7 min for ritonavir and lopinavir, respectively. The developed HPLC method was also validated for important performance characteristics such as linearity, accuracy and precision. Linearity of the developed method was evaluated by using the correlation coefficient greater than 0.999 for both drugs. Accuracy was expressed as the percent of recovery and closed to 100%. Good precision was also obtained with the % RSD of less than 2 for all cases. The developed method was then applied to determine lopinavir and ritonavir in syrup sample. The percent labeled amount of both drugs obtained from HPLC method were 100.5% and 100.3% for lopinavir and ritonavir, respectively.

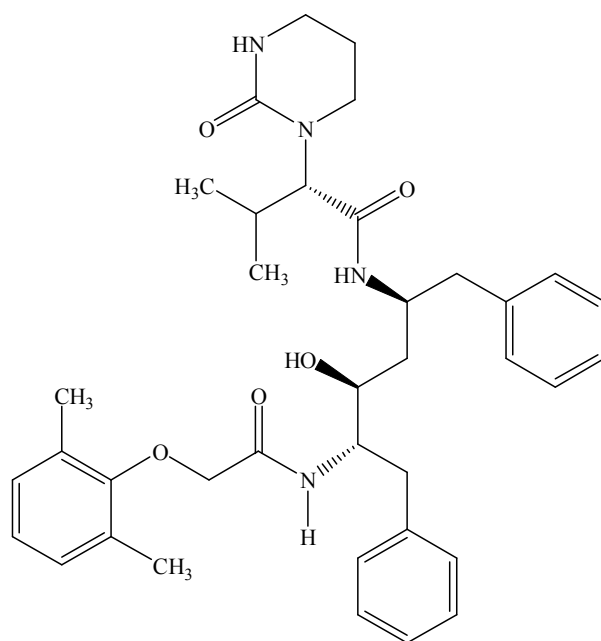
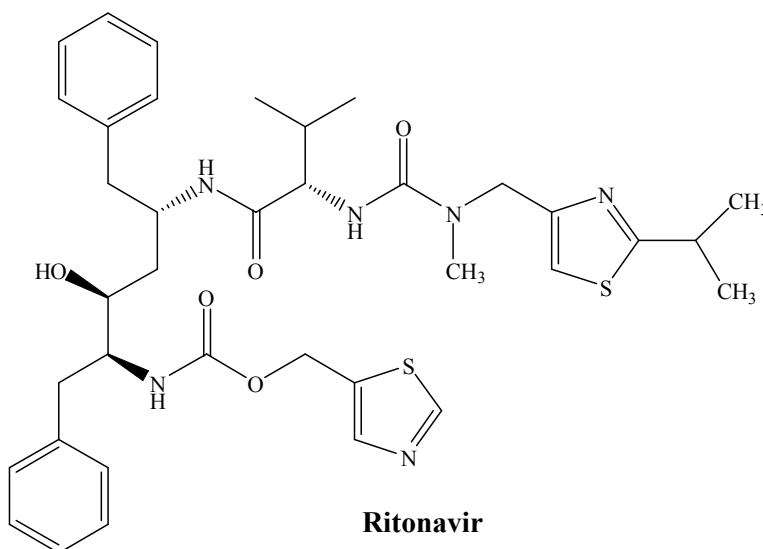
Key words: Lopinavir, Ritonavir, Protease inhibitors, HPLC

INTRODUCTION

Lopinavir and ritonavir (Figure 1) are protease inhibitors (PIs) which can prevent viral replication by inhibiting the activity of HIV-1 protease enzyme which is necessary to cleave nascent proteins for final assembly of new virus. These two drugs manufactured as a fixed combination by Abbott laboratories under the trade name of Kaletra[®] and this combination was approved by US FDA in September 2000. Lopinavir is approximately ten times more potent than ritonavir to fight against wild-type HIV. For ritonavir, it is a potent cytochrome P450 (CYP3A) inhibitor and

usually used as pharmacokinetic booster for other PIs including lopinavir¹. To analyze these drugs and other PIs, several determination methods have been reported. These included high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS)²⁻⁵, matrix-assisted laser desorption/ionization, tandem time-of-flight (MALDI-TOF)⁶, high-pressure thin layer chromatography (HPTLC)⁷ and immunoassay methods⁸. This study aims to develop a simple liquid chromatographic method with UV detection as an alternative method for the determination of lopinavir and ritonavir in syrup.

*Corresponding author: Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhya Road, Bangkok 10400, Thailand.
Email: pycmt@mahidol.ac.th

**Lopinavir****Ritonavir****Figure 1.** Chemical structures of lopinavir and ritonavir.

MATERIALS AND METHODS

Instrumentation

The chromatographic system was Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Japan) consisted of LC-10AD pump, a SPD-10A UV-Vis detector, a class LC-10 workstation and a Rheodyne 7125 injector with 20 μ L loop (Rheodyne, USA). BDS Hypersil C18 (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m) supplied by Thermo Scientific (USA) was used for the separation of lopinavir and ritonavir.

Reagents and Chemicals

Standards Lopinavir, ritonavir, syrup sample and placebo syrup were kindly donated by The Government Pharmaceutical Organization (GPO, Bangkok, Thailand). Ammonium acetate (analytical grade) was purchased from RFCL limited (New Delhi, India). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Lab-scan (Bangkok, Thailand) and deionized water was purchased from Thai Nakorn Patana Co.Ltd., (Bangkok, Thailand).

Standard preparations

Stock standard solutions of lopinavir and ritonavir at the concentration of 1 mg/ml were separately prepared by dissolving accurately weighed amount of the drugs in methanol. Working standard solution of ritonavir was prepared by dilution of its stock solution with 50% methanol until the final concentration of 0.1 mg/ml was obtained.

Preparation of calibration curves

The standard mixtures of lopinavir (2, 6, 10, 14 and 18 $\mu\text{g/ml}$) and ritonavir (0.4, 1.4, 2.4, 3.4 and 4.4 $\mu\text{g/ml}$) were prepared in 10 ml volumetric flasks by using lopinavir stock standard solution and ritonavir working standard solution. All standard mixtures were adjusted to volume with 50% methanol. Each standard mixture solution was injected into chromatographic instrument described above and the optimum mobile phase system. The calibration curve of each drug was separately plotted between concentrations (x-axis) versus corresponding peak areas (y-axis).

Sample preparation

Sample stock solution was prepared by dilution 100 μl of syrup sample with methanol in 10 ml volumetric flask. Then, 100 μl of this solution was transferred into 10 ml volumetric flask and made up to volume with 50% methanol. Desired concentration of sample was 8 $\mu\text{g/ml}$ of lopinavir and 2 $\mu\text{g/ml}$ of ritonavir in 50% methanol. This solution was filtered by using 13 mm, 0.45 μm nylon syringe filter before injecting into the HPLC column.

Method development

Standard mixture solution containing 32 $\mu\text{g/ml}$ of lopinavir and 8 $\mu\text{g/ml}$ of ritonavir was employed for HPLC method development. A HPLC method was developed utilizing a BDS Hypersil C18 (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm) HPLC columns. Mobile phase conditions such as type and concentration of organic solvents, effect of type, pH and concentration of buffer, were studied to obtain a suitable separation

condition which yielded the lowest run time and acceptable chromatographic parameters such as resolution and peak shape. Two types of organic solvents, methanol and acetonitrile, were investigated for this approach. Various percent of acetonitrile were used to study the effect of organic solvent concentration. Effects of types and pH of buffer were studied with ammonium acetate and potassium phosphate. Mobile phase containing 10 mM of ammonium acetate or potassium phosphate buffer and acetonitrile (50:50, v/v) were prepared and studied. For effect of pH, a chosen buffer was investigated in the pH range of 3-8. The mobile phase flow rate was maintained at 1 ml/min through the study. The presence of interest compounds was detected at 245 nm with UV detector.

Validation of the method

Performance characteristics selected for method validation were linearity, accuracy, precision, specificity and range.

Linearity

Linearity was evaluated in the concentration range of 2-18 $\mu\text{g/ml}$ for lopinavir and 0.4 - 4.4 $\mu\text{g/ml}$ for ritonavir. The data were analyzed by least-squares linear regression method.

Accuracy

Accuracy of the developed method was studied by standard addition. The sample containing 4 $\mu\text{g/ml}$ of lopinavir and 1 $\mu\text{g/ml}$ of ritonavir was added to standard mixtures at the same concentration range for linearity study (2-18 $\mu\text{g/ml}$ for lopinavir and 0.4 - 4.4 $\mu\text{g/ml}$ for ritonavir). Accuracy was accessed in term of recovery percent of standards added.

Precision

Precision was investigated for both intra-day and inter-day precision. For intra-day precision, three concentration levels of standard mixtures (2, 10 and 18 $\mu\text{g/ml}$ for lopinavir and 0.2, 2.4 and 4.8 $\mu\text{g/ml}$ for ritonavir) were analyzed. Six determinations were done for each concentration on the same day. All solutions were injected in three replicates.

For inter-day precision, the same three different concentrations as for intra-day were studied on six different days and each concentration was triplicately injected. The precision of the method was expressed as the percentage of relative standard deviation (%RSD).

Specificity

Specificity was performed by using the chromatograms of unspiked sample, spiked drug substances (at 100% level) and placebo syrup. Sample containing ritonavir (2 µg/ml) and lopinavir (8 µg/ml) was used as unspiked sample. Standard mixture containing ritonavir (2 µg/ml) and lopinavir (8 µg/ml) was added to the same concentration of above sample and used as spiked sample. Chromatogram of placebo syrup was obtained by injecting the placebo at the same dilution as unspiked and spiked drug substances. All of the above solutions were prepared in 10 ml volumetric flask and 50% methanol was used as solvent.

Range

The upper and lower concentrations of the method were set up by the evaluation of linearity, accuracy and precision results.

RESULTS AND DISCUSSION

Method development

Effects of organic solvent

Effects of methanol and acetonitrile on the separation of desired compounds were investigated. Four mobile phases containing methanol or acetonitrile and water or 5 mM ammonium acetate buffer (50:50, v/v) were prepared and studied. No lopinavir and ritonavir peaks were observed in the mobile phase containing methanol and water (Figure 2A) or 5 mM ammonium acetate buffer (Figure 2B). The better chromatograms were obtained from the mobile phase containing acetonitrile, as shown in Figure 2 (C) and (D). Therefore, acetonitrile was selected for further studies.

The various percent (v/v) of acetonitrile (40, 45, 50, 55) in 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7, were prepared and studied. As

can be seen in Figure 3 (A), it took 60 minutes to elute lopinavir out off the column for the mobile phase containing 40% of acetonitrile. The best result for this study was obtained from the condition containing 55% acetonitrile. The retention times for this condition were about 8.8 minutes for ritonavir and 10.2 minutes for lopinavir. The good peak shapes were also achieved under this condition. However, to avoid the precipitation of buffer in high concentration of organic solvent, 50% acetonitrile was chosen for further studies.

Effects of types and pH of buffer

Two types of buffer, ammonium acetate and potassium phosphate, were studied. Mobile phase containing 10 mM of buffer and acetonitrile (50:50, v/v) were prepared and used to separate lopinavir and ritonavir. As illustrated in Figure 4, the shorten retention time of both drugs and good peak shapes were obtained from the mobile phase containing ammonium acetate buffer. Therefore, ammonium acetate was selected as a suitable buffer for further studies.

Selection of suitable buffer concentration is essential for chromatographic separation. High concentration of buffer has good efficiency to control pH but the precipitation in organic solvent can occur. Low concentration of buffer can avoid precipitation problem but this may result in the irreproducible retention time. Ammonium acetate buffer concentrations of 5-40 mM were evaluated for the effect on retention time of analytes. As seen in Figure 5, the mobile containing 20 mM ammonium acetate provided the shortest retention time for both drugs.

Effects of pH on the retention times of lopinavir and ritonavir are presented in Figure 6. Mobile phase containing 5 mM ammonium acetate and acetonitrile (48:52, v/v) was used to study the effect of pH. The pH of 5 mM ammonium acetate buffer was investigated in the pH range of 3-8. Both lopinavir and ritonavir posses low pK_a value, less than 3.7. As a result, it was found that an increase in the value of pH decreased retention time on both drugs. The pH 7 was selected as optimum pH for further studies.

Summary of chromatographic optimization

According to above studies, the optimal chromatographic condition was obtained. Lopinavir and ritonavir were separated on BDS Hypersil C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m). The mobile phase was 50:50 (v/v) acetonitrile and 5 mM

ammonium acetate (pH 7). Isocratic elution was used and operated at the flow rate of 1 ml/min. The UV detection was 245 nm and the injection volume was 20 μ l. Lopinavir and ritonavir were separated well on this condition with the retention time of 14.71 minutes and 12.47 minutes (Figure 7).

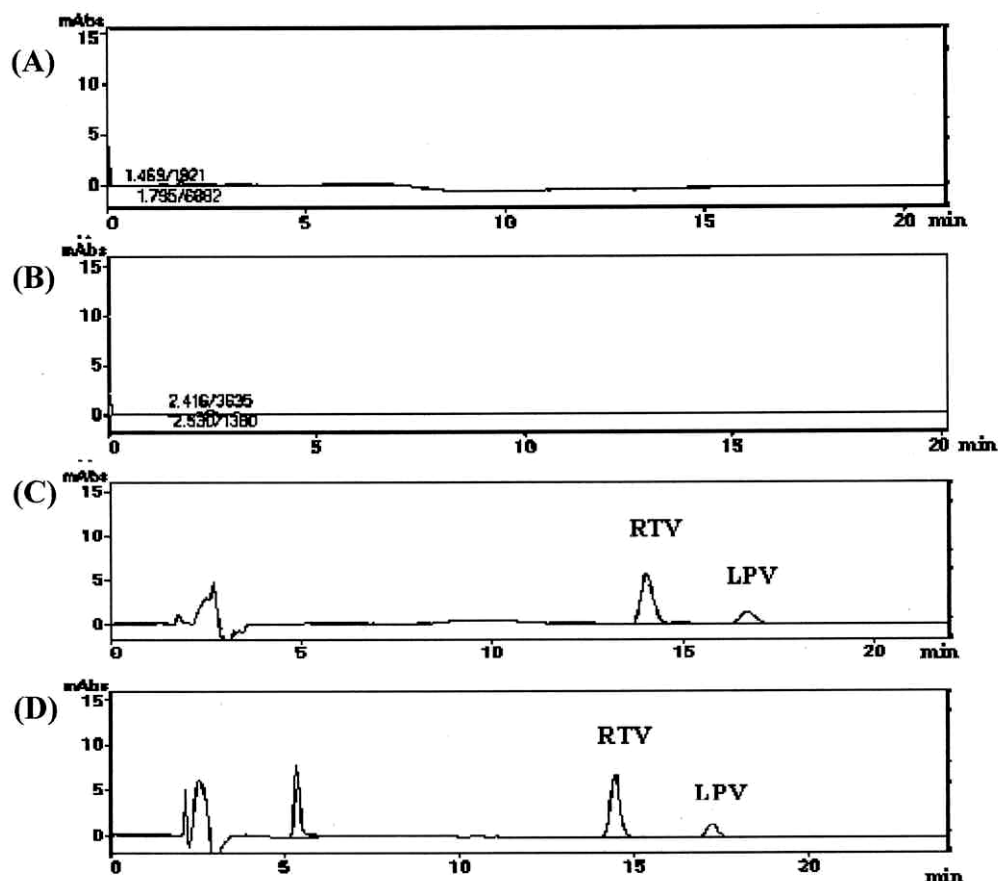


Figure 2. Chromatograms of lopinavir (32 μ g/ml) and ritonavir (8 μ g/ml) obtained from HPLC system with a BDS Hypersil C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m) and mobile phase was (A) water and methanol (50:50, v/v); (B) 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and methanol (50:50, v/v); (C) water and acetonitrile (50:50, v/v); (D) 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (50:50, v/v). The flow rate was 1 ml/min and UV detection was 245 nm.

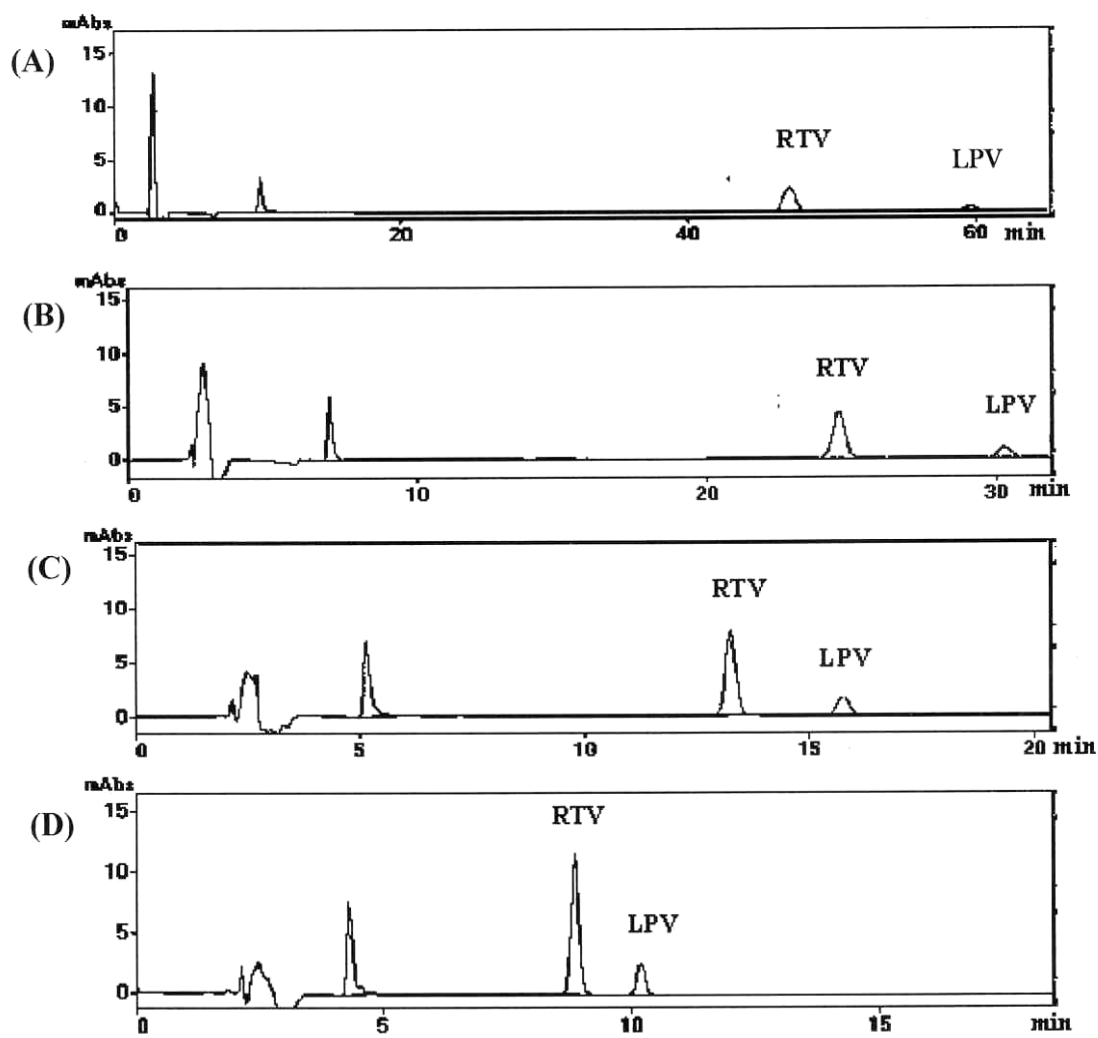


Figure 3. Chromatograms of lopinavir (32 $\mu\text{g/ml}$) and ritonavir (8 $\mu\text{g/ml}$) obtained from HPLC system with a BDS Hypersil C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 μm) and mobile phase was (A) 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (60:40, v/v); (B) 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (55:45, v/v); (C) 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (50:50, v/v); (D) 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (45:55, v/v). The flow rate was 1 ml/min and UV detection was 245 nm.

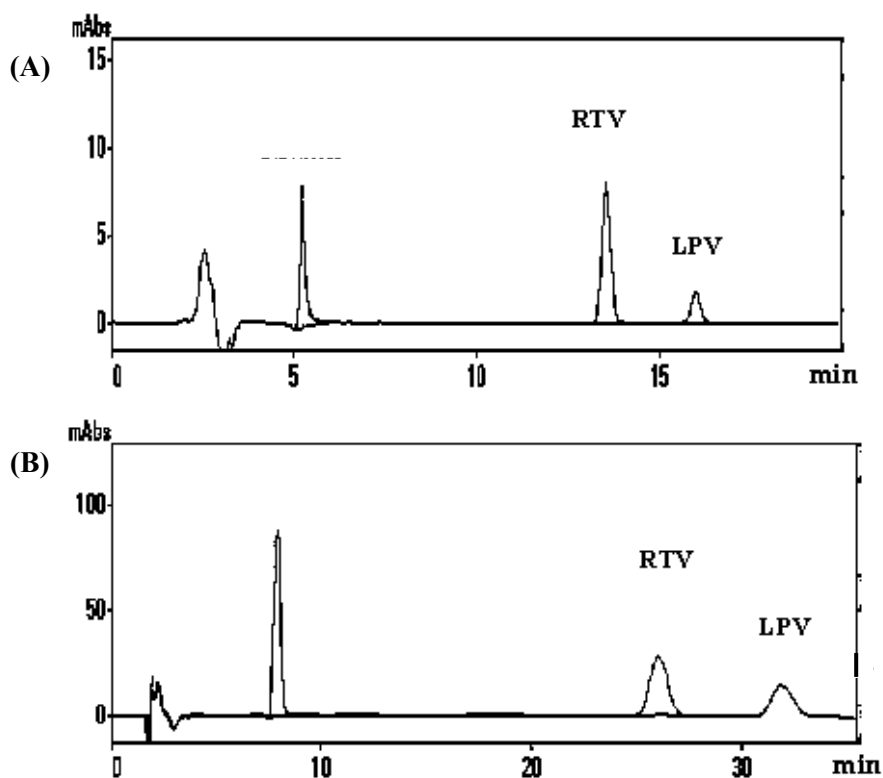


Figure 4. Chromatograms of lopinavir (32 $\mu\text{g/ml}$) and ritonavir (8 $\mu\text{g/ml}$) obtained from HPLC system with C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μm) and mobile phase was (A) 10 mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (50:50, v/v); (B) 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7 and acetonitrile (50:50, v/v). The flow rate was 1 ml/min and UV detection was 245 nm.

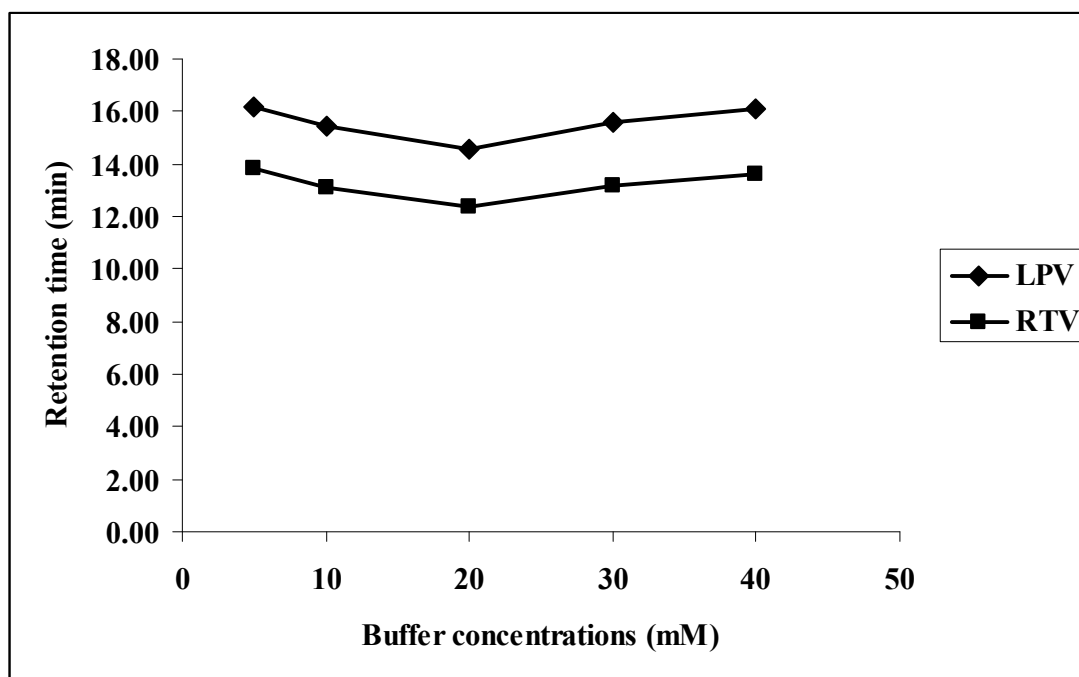


Figure 5. Effect of buffer concentration on the retention times of lopinavir and ritonavir.

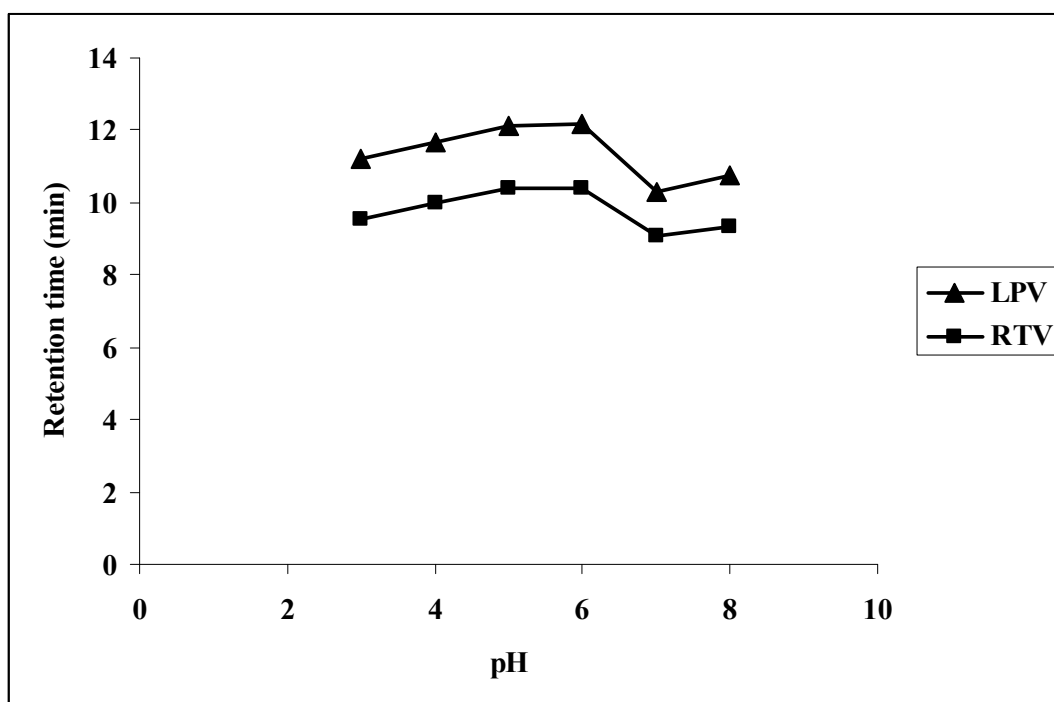


Figure 6. Effect of buffer pH on the retention times of lopinavir and ritonavir.

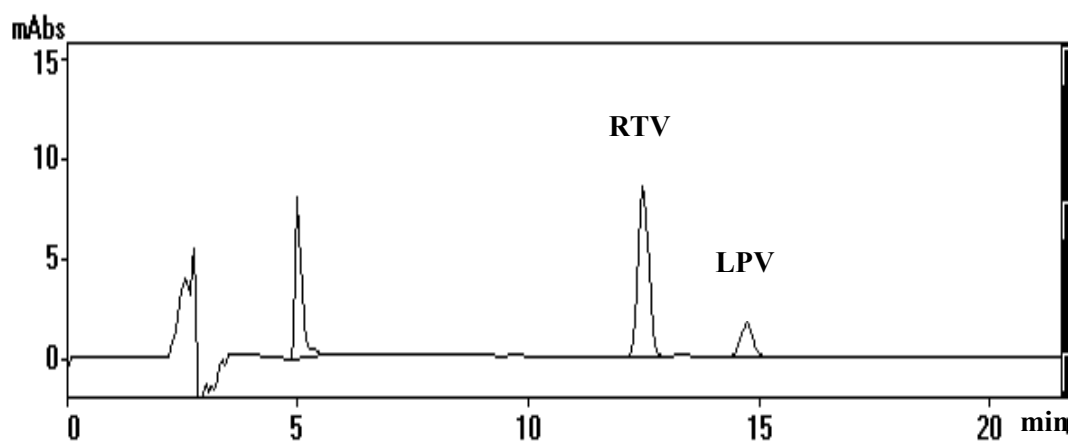


Figure 7. The chromatogram of lopinavir and ritonavir on the optimum chromatographic condition. HPLC column was BDS Hypersil C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m) and mobile phase was 5mM ammonium acetate buffer, pH 7 with acetonitrile (50:50, v/v). The flow rate was 1 ml/min and UV detection was 245 nm.

Validation of the method

Linearity

The linear dependence of the peak area and concentration of lopinavir was evaluated in the concentration range of 2-8 µg/ml. Excellent linearity was obtained over the entire concentration range and correlation coefficient (r^2) was greater than 0.999. The relationship between concentration of lopinavir (x-axis) and peak area (y-axis) was $y = 968.8x - 203.6$. For ritonavir, the calibration curve was linear over the concentration range of 0.4-4.4 µg/ml with the correlation coefficient (r^2) greater than 0.999. The relationship between concentration

of lopinavir (x-axis) and peak area (y-axis) was $y = 15653x + 669.07$.

Accuracy

Accuracy was represented by the recovery percent of standard found and standard added to the sample. The mean value at each concentration level is shown in Table 1. The average recovery of lopinavir over the concentration range of 2-18 µg/ml was 98.9 to 99.9% and the average recovery of ritonavir over the concentration range of 0.4-4.4 µg/ml was 98.8 to 100.5%. Good recoveries of both drugs implied that the developed HPLC method was suitable for separation of desired drugs in syrup.

Table 1. Recovery data of standards lopinavir and ritonavir from spiked sample

Drugs	Concentration level (µg/ml)	% Recovery (mean ± SD, n = 3)
Lopinavir	2	99.65 ± 0.39
	6	99.69 ± 1.28
	10	99.94 ± 1.53
	14	98.91 ± 0.47
	18	99.42 ± 1.55
Ritonavir	0.4	100.07 ± 1.16
	1.4	98.77 ± 0.97
	2.4	99.41 ± 1.69
	3.4	99.87 ± 1.77
	4.4	100.51 ± 1.73

Precision

As summarized in Table 2, the intra-day precision of determination, as indicated by the relative standard deviation (RSD) value, for lopinavir ranged from 0.99 to 1.54% while the intra-day precision of ritonavir ranged from 1.20 to 1.97%. The inter-day precision for both drugs were less than 1.92 % over the entire concentration range 2–18 µg/ml for lopinavir and 0.4–4.4 µg/ml for ritonavir. These results showed that the proposed HPLC method yielded a satisfactory precision for analysis of lopinavir and ritonavir.

Specificity

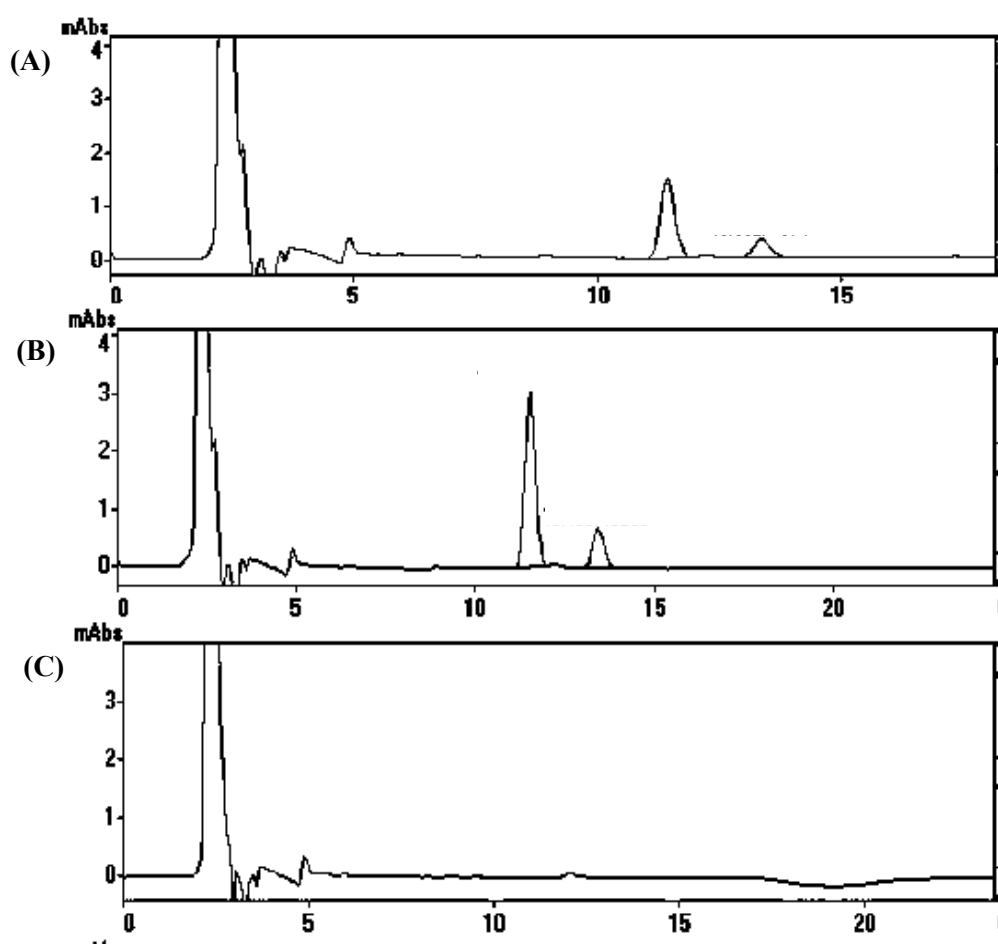
Specificity was accessed in order to prove that the developed analytical method could select the interested analytes even

though there were expected components such as impurities, degradation products and matrix components. Specificity was performed by demonstrating the chromatograms of unspiked sample, spike drug substances (at 100% level) and placebo syrup. All of these chromatograms are shown in Figure 8.

It was found that peak area of spiked drug substances (at 100% level) of both lopinavir and ritonavir were two times greater than unspiked sample. Chromatogram of placebo showed that there was not any peak presented at the same retention time of the desired compounds. It was indicated that syrup matrices did not interfere the determination of the interested analytes.

Table 2. Analytical data of intra-day and inter-day precision of standards lopinavir and ritonavir

Drugs	Precision	Concentration level ($\mu\text{g/ml}$)	% RSD (n = 6)
Lopinavir	Intra-day	2	1.54
		10	1.04
		18	0.99
	Inter-day	2	1.92
		10	1.53
		18	0.92
Ritonavir	Intra-day	0.4	1.20
		2.4	1.97
		4.4	1.40
	Inter-day	0.4	1.79
		2.4	1.75
		4.4	1.58

**Figure 8.** HPLC chromatograms of unspiked sample (A), spiked drug substances (B) and placebo syrup (C). Analytical column was a BDS Hypersil C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 μm). Mobile phase was 20 mM ammonium acetate pH7 and acetonitrile (50:50, v/v). The flow rate was 1 ml/min, injection volume was 20 μL , detector was set at 245 nm.

Range

By evaluation of linearity, accuracy and precision results, it was found that the upper and lower concentrations with acceptable linearity, accuracy and precision were 2 and 18 µg/ml for lopinavir and 0.4 and 4.4 µg/ml for ritonavir.

Determination of syrup

The developed method was applied to determine lopinavir and ritonavir in syrup. The determination results were illustrated in Table 3. The results showed that the developed method can apply to real sample with good reproducibility.

Table 3. The concentrations of drugs in syrup sample obtained from HPLC method

Descriptions	Sample 1	Sample 2
Lopinavir		
Amount found (mg/ml)	80.10	80.64
Labeled claim (mg/ml)	80.00	80.00
% Labeled amount	100.1	100.8
Average	100.5	
Ritonavir		
Amount found (mg/ml)	20.00	20.10
Labeled claim (mg/ml)	20.00	20.00
% Labeled amount	100.0	100.5
Average	100.3	

CONCLUSION

In summary, a simple and rapid HPLC method was developed for the simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in syrup. Dilution and filtration were only required for sample preparation. The excellent validation results were also achieved indicating the reliable of the developed HPLC method. In addition, the proposed method was applied very well to the real sample. This method may use as an alternative procedure for determination of other PIs drugs since its advantages were over the existing methods when the simple mobile phase and detector were utilized.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank The Thailand Research Fund (TRF) for financial supports, The Government Pharmaceutical Organization (GPO) for drug substances and syrup sample. The Faculty of Pharmacy, Mahidol University was also thankful for research facilities.

REFERENCES

1. Dickinson L, Robinson L, Tjia J, et al. Simultaneous determination of HIV protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005; 829:82-90.
2. Ehrhardt M, Möck M, Haefeli WE, et al. Monitoring of lopinavir and ritonavir in peripheral blood mononuclear cells, plasma, and ultrafiltrate using a selective and highly sensitive LC/MS/MS assay. *J Chromatogr B* 2007; 850:249-58.
3. D'Avolio A, Siccardi M, Sciandra M, et al. HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients. *J Chromatogr B* 2007; 859:234-40.
4. Heine RT, Rosing H, Van Gorp ECM, et al. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2008; 867: 205-12.

5. Temghare GA, Shetye SS, Joshi SS. Rapid and sensitive method for quantitative determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *E-J Chem* 2009; 6(1): 223-30.
6. Notari S, Mancone C, Tripodi M, et al. Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF. *J Chromatogr B* 2006; 833:109-16.
7. Sulebhavikar AV, Pawar UD, Mangoankar KV, et al. ND. HPTLC methods for simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in capsule dosage form. *E-J Chem* 2008; 5(4):706-12.
8. Azoulay S, Nevers MC, Creminon C, et al. An enzyme immunoassay for the quantification of plasma and intracellular lopinavir in HIV-infected patients. *J Immunol Methods* 2004; 295:37-48.

Chemometrics-assisted UV spectrophotometric method for determination of lopinavir and ritonavir in syrup

Chutima Matayatsuk Phechkrajang^{1,2*}, Ei Ei Thin¹, Lawan Sratthaphut³, Duangjai Nacapricha^{2,4}, Prapin Wilairat^{2,4}

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand, ²Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (First Labs), ³Department of Health-Related Informatics, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakornpathom Campus, ⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand.

* Corresponding author. Email: pycmt@mahidol.ac.th

Address. Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447-Sri Ayuthaya Rd., Payathai, Rachathevi, Bangkok, 10400, Thailand

Abstract

Lopinavir and ritonavir are effective HIV-1 protease inhibitors. Chemometric-assisted spectrophotometric method was proposed for the determination of these two drugs. A set of calibration mixtures (calibration set) was designed by the Central Composite Design (CCD). The UV spectra results obtained from the calibration set were subjected to principle component regression (PCR) and partial least squares regression (PLS-1) to construct the prediction models for lopinavir and ritonavir in unknown samples. A set of synthetic mixtures was randomly selected and used as samples to validate the models. The prediction models were used to analyze two drugs in syrup and compared with a HPLC method. The results of PCR and PLS-1 methods were agreed with the results obtained from HPLC method.

Key Words: Chemometrics; PCR; PLS-1; Lopinavir; Ritonavir

Introduction

Two protease inhibitors, lopinavir and ritonavir, are important drugs in highly active anti-retroviral therapy (HAART). Protease inhibitor can prevent viral replication by inhibiting the activity of HIV-1 protease enzyme which is necessary to cleave nascent proteins for final assembly of new virions. Lopinavir and ritonavir are manufactured as a fixed combination by Abbott Laboratories under the trade name Kaletra®. Lopinavir is approximately ten times more potent than ritonavir against wild-type HIV. In order to prohibit the metabolism of CYP3A4, small amount of ritonavir is used as pharmacokinetics booster in Kaletra® [1].

For analysis of lopinavir and ritonavir, high-performance liquid chromatography (HPLC) [2, 3, 4], high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS) [5, 6, 7, 8, 9], LC/MS/MS [10], matrix-assisted laser desorption/ ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) [11], HPTLC [12] and immunoassay [13] methods have been reported for quantitative determination of lopinavir and ritonavir. All of these, chromatographic method, high-performance liquid chromatography (HPLC) in conjunction with UV detection was the most widely used. Analysis method utilizing spectrophotometric measurement without prior chromatographic separation is interesting but overlapping of absorbance spectra is a problem. However, chemometrics is

a key and may solve this limitation. Chemometrics was introduced in 1972 by Svan Wold [14]. It is a chemical discipline which uses mathematical and statistical methods to design or select optimal measurement procedures and experiments and provide maximum chemical information by analyzing chemical data [15]. In brief, chemometrics concerns with chemical data and extraction of relevant information from it by using suitable statistical and mathematical methods. Multivariate calibration method (e.g., multiple linear regression (MLR), principle component regression (PCR) and partial least squares (PLS)) utilizing spectrophotometric data are the important chemometrics approach for determination of mixtures including drugs combination [16].

In this work, two chemometric-assisted spectrophotometric methods based on the application of principle component regression and partial least squares were proposed for analysis of lopinavir and ritonavir in synthetic mixtures (test set) and true sample (syrup). A HPLC method was employed to determine the same syrup for comparison.

Materials and Methods

Apparatus and software

The absorbance spectra were recorded by a Shimadzu (UV-160A) UV-Vis spectrophotometer combined with a 1 cm quartz cell.

Chromatography was performed on a high-performance liquid chromatography system (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) consisting degasser DGU-12A, liquid chromatograph LC-10 AD, communications bus module CBM-10A, UV-Visible detector SPD-10A and data processing (class LC-10). The analytical column was a BDS Hypersil C18, 250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m (Thermo scientific, USA). Manual injection was made by using a Rheodyne model 7725 injector with a 20- μ l loop. Unscrambler[®] program was purchased from Charpa Techcenter Co., Ltd. (Bangkok, Thailand). Data analysis, PCR and PLS-1 modeling were performed by Unscrambler[®] program.

Reagents

Standard lopinavir and ritonavir, syrup containing 80 mg/mL of lopinavir and 20 mg/mL of ritonavir and syrup blank were kindly supported from the Government Pharmaceutical Organization (GPO) of Thailand. Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were purchased from Lab-Scan, Thailand. Ammonium acetate (Analytical grade) was obtained from Ranken, India. Acetic acid and ammonium hydroxide (Analytical grade) were obtained from Lab-Scan, Thailand. Stock solutions of drugs (1 mg/mL) were prepared by dissolving appropriate amount of solutes in methanol. Working solutions of lower concentrations were prepared by proper dilution from the stock standard solutions and diluted to volume

with 50% methanol. Sample preparation was prepared by dilution of syrup with methanol until the final concentration (8 $\mu\text{g/mL}$ of lopinavir and 2 $\mu\text{g/mL}$ of ritonavir) was obtained. Syrup blank working solution was prepared by 100 times dilution of syrup blank with methanol.

One component calibration

To find the linear dynamic concentration range of each drug, one component calibration was performed. Linear dynamic ranges were studied in the concentration range of 4-24 $\mu\text{g/mL}$ for lopinavir and 1-6 $\mu\text{g/mL}$ for ritonavir. Absorbance values were recorded at λ_{max} of each drug (259 nm for lopinavir and 239 nm for ritonavir) in 1-cm quartz cell and used 50% methanol as blank. Linear dynamic range for each compound was determined by least-square linear regression of concentration and the corresponding absorbance.

Binary standards solutions

Two sets of standard solutions, calibration set and test set were prepared. According to Table 1 and 2, 20 mixtures solutions and 15 mixtures solutions were used in calibration set and test set, respectively. The concentrations of calibration set were selected by mean of central composite design (CCD) and those of test set were randomly selected. A 100 μl of syrup blank working solution was added to all solution in calibration and test sets.

HPLC method for analysis of lopinavir and ritonavir

A HPLC method was previously developed for simultaneous determination of lopinavir and ritonavir [17]. The optimum chromatographic condition used a BDS Hypersil C18, 250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m as stationary phase. A mixture of 5mM ammonium acetate buffer, pH 7 and acetonitrile (50:50, v/v) was used as mobile phase and the flow rate was 1 mL/min. The presences of lopinavir and ritonavir were detected by UV detector at 245 nm. This HPLC method was used to determine lopinavir and ritonavir in test set and syrup samples for comparison with PCR and PLS-1 models.

Table 1 Compositions of CCD design for construction the determination models of lopinavir and ritonavir (calibration set)

Sample	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)		Volume of placebo stock solution (μL)
	Lopinavir	Ritonavir	
1	0.00	2.00	100
2	16.00	2.00	100
3	8.00	0.00	100
4	8.00	4.00	100
5	2.30	0.60	100
6	13.60	0.60	100
7	13.60	3.40	100
8	2.30	3.40	100
9	8.00	2.00	100
10	8.00	2.00	100
11	8.00	2.00	100
12	8.00	2.00	100
13	8.00	2.00	100
14	8.00	2.00	100
15	8.00	2.00	100
16	8.00	2.00	100
17	0.00	0.00	100
18	0.00	0.00	100
19	0.00	0.00	100
20	0.00	0.00	100

Table 2 Compositions of samples for test set

Sample	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)		Volume of placebo stock solution (μL)
	Lopinavir	Ritonavir	
1	4.00	1.00	100
2	7.00	1.75	100
3	8.00	2.00	100
4	9.00	2.50	100
5	12.00	3.00	100
6	10.00	0.60	100
7	12.00	1.00	100
8	4.00	3.00	100
9	2.40	2.00	100
10	15.00	1.50	100
11	7.00	3.75	100
12	6.00	2.50	100
13	8.00	1.75	100
14	13.00	0.75	100
15	3.00	3.15	100

Results and discussion

Lopinavir and ritonavir absorb UV in the same region (Figure 1), this was not allowed for simultaneous determination of these compounds by conventional univariate calibration methods. Therefore, multivariate

calibration methods such as PCR and PLS-1 were employed for simultaneous analysis of them.

The standard solutions used in the multivariate calibration methods are mixtures of analytes. Some important parameters should be considered in preparing of these standard solutions [18]. The first one is that the concentration of each analyte must be in its linear dynamic range. The concentration of the analytes in the calibration samples (Table 1) must be orthogonal. The absorbance of calibration samples should not exceed the maximum absorbance reading of the instrument, and the concentration of the prediction mixtures (test set) should be the same range as that of the calibration mixtures.

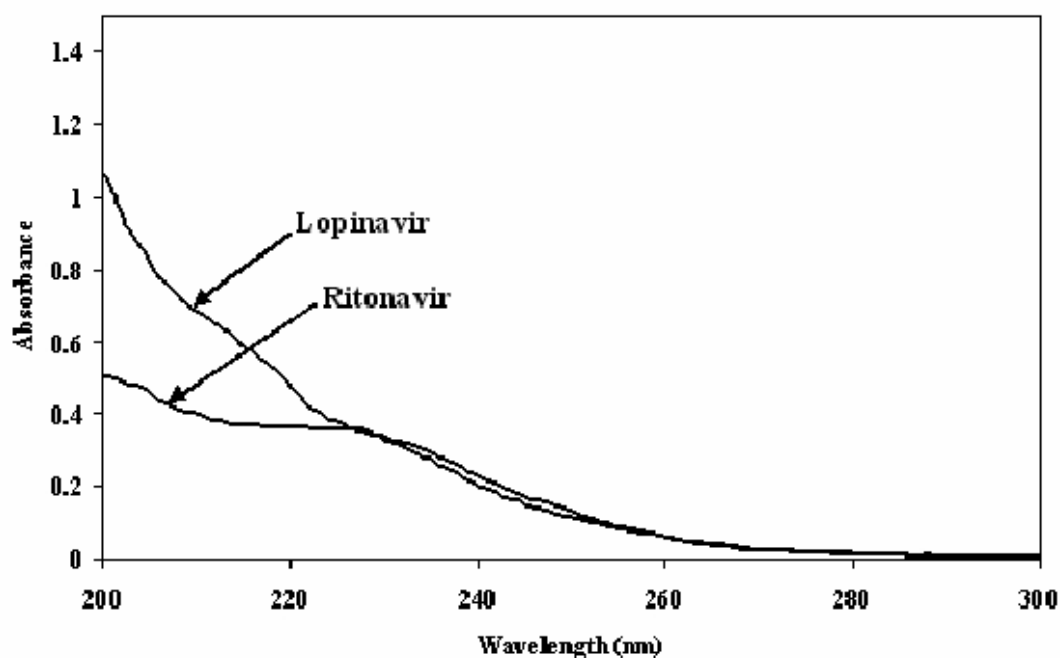


Figure 1
UV spectra of lopinavir and ritonavir

The resulted univariate calibration equations for the analytes at $\lambda_{\max}$ (259 and 239 nm for lopinavir and ritonavir, respectively) were linear in the ranges of 4-24 $\mu\text{g/mL}$ for lopinavir and 1-6 $\mu\text{g/mL}$ for ritonavir (Figure 2). To prevent obtained solutions with overload absorbencies, the concentrations of lopinavir and ritonavir in the mixtures were taken in the ranges of 0-16 and 0-4 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The composition of the test samples (Table 2) was selected randomly according to the linear dynamic ranges.

Results of PCR and PLS-1 analysis

The PCR and PLS-1 models were developed in Unscrambler[®] program. Model development was performed by using calibration standards. Leave-one-out cross-validation (LOO-CV) was used to validate PCR and PLS-1 models in model development and obtaining optimum latent variables (number of factors) of model. The resulted models were also validated to predict the concentration of analytes in a separate test set that did not contribute to the model development steps. The results of prediction and the percentage of recoveries are represented in Table 3. As observed, there is a very good agreement between the predicted (calculated) and actual concentrations of drugs. The mean recoveries for lopinavir and ritonavir are 105.5% and 92.5% for PCR models and 105.3% and 94.8% for PLS-1 models, confirming the high prediction power of the

resulted models. Then the suitable PCR and PLS-1 models were employed to analyze both drugs in syrup and three determinations were performed. The determination results are presented in Table 4. As seen from this Table 4, the data indicate excellent reproducibility of the prediction by the proposed models with the standard deviation (SD) less than 0.33 for all cases.

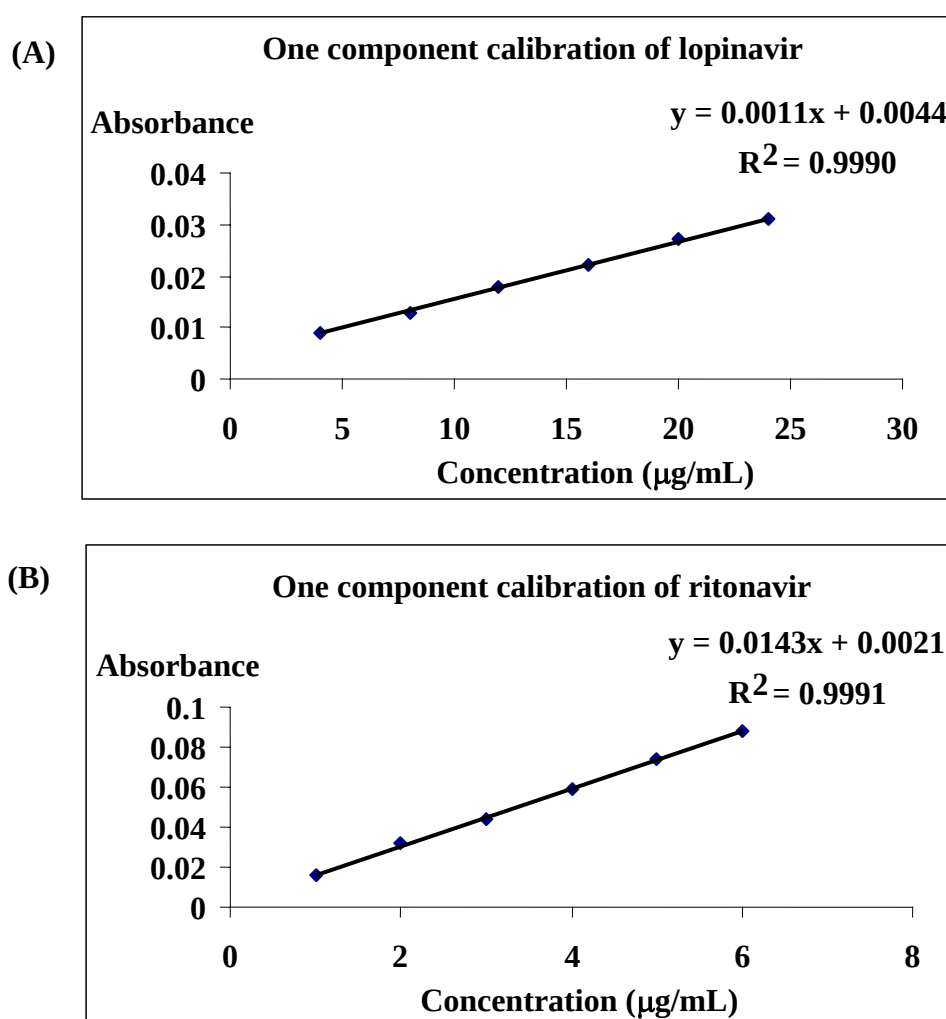


Figure 2

(A) Absorbance values at 259 nm versus concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of standard lopinavir and (B) Absorbance values at 239 nm versus concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of standard ritonavir

Table 3 Comparison of PCR and PLS-1 models for determination of lopinavir and ritonavir in test set

Test set number	Lopinavir (% recovery)		Ritonavir (% recovery)	
	PLS-1	PCR	PLS-1	PCR
1	102.7	104.2	92.0	71.0
2	104.1	104.3	91.4	87.4
3	106.7	107.1	88.0	99.0
4	105.9	106.0	101.8	95.6
5	104.9	104.9	95.7	99.0
6	102.1	102.4	86.7	121.7
7	102.5	102.5	89.0	104.0
8	111.5	111.7	83.3	93.0
9	106.7	107.5	91.0	87.0
10	102.0	100.9	112.7	83.3
11	108.0	106.7	85.9	76.5
12	102.7	103.2	97.6	93.6
13	104.9	105.0	97.7	96.0
14	99.0	98.7	121.3	90.7
15	115.3	117.0	88.0	89.5
Average	105.3	105.5	94.8	92.5
SD	4.1	4.4	10.4	11.8

Comparison of the PCR and PLS-1 models with HPLC

In order to compare the results of the proposed PCR and PLS-1 models for determination of lopinavir and ritonavir in syrup, a HPLC

method [17] was also employed. The same sample solutions used for PCR and PLS-1 models were applied by HPLC method. The determination results of PCR, PLS-1 and HPLC methods are presented in Table 4. The determination data were expressed in term of $\mu\text{g/ml}$. As shown in this Table, amount of drugs analyzed by HPLC method were closed to those obtained by PCR and PLS-1 models, especially for lopinavir. In case of ritonavir, the results obtained from PLS-1 and PCR models were significantly less than that of HPLC method. This may be due to the fact that the UV spectrum of ritonavir is absolutely covered with the spectrum of lopinavir (Figure 1) and is not allow for application of multivariate calibration model. In the other word, multivariate calibration model may suitable for the mixtures which their UV spectra are partially overlapping.

Table 4 Syrup determination results of PLS-1, PCR and HPLC methods

Sample	Lopinavir ($\mu\text{g/mL}$)			Ritonavir ($\mu\text{g/mL}$)		
	PLS-1	PCR	HPLC	PLS-1	PCR	HPLC
1	8.06	8.02	8.01	1.68	1.62	2.00
2	8.00	7.98	7.46	1.63	1.64	1.86
3	7.93	7.89	8.06	1.58	1.47	2.01
Average	8.00	7.96	7.85	1.63	1.58	1.96
SD	0.07	0.07	0.33	0.05	0.09	0.08

Conclusions

In summary, principle component regression (PCR) and partial least-square regression (PLS-1) models were developed for determination of lopinavir and ritonavir in a standard mixture set (test set) which was not contribute in the calibration step. Similar accuracy was obtained from two multivariate calibration methods. The same results were also performed when multivariate calibration models were applied to determine drugs in syrup. To evaluate the results obtained by multivariate calibration methods, a HPLC procedure was also used. The results obtained from PLS-1 and PCR models closed to those obtained from HPLC method. This implies that the proposed PCR and PLS-1 models are simple, accurate and precise procedures.

Acknowledgements

The authors would like to thank The Thailand Research Fund (MRG5280225) for financial support and the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of pharmacy, Mahidol University for research facilities.

References

1. Dickinson L., Robinson L., Tjia J., Khoo S., Back D., Simultaneous determination of HIV protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J Chromatogr B.*, 2005, 829, 82-90.
2. Albert V., Modamino P., Lastra C.F., Mariño E.L., Determination of saquinavir and ritonavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography and the analytical error function., *J Pharm Biomed Anal.*, 2004, 36, 835-840.
3. Notari S., Bocedi A., Ippilito G., Narciso P., Pucillo L.P., Tossini G., Donnorso R.P., Gasparrini F., Ascenzi P., Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography., *J Chromatogr B.*, 2006a, 831, 258-266.
4. Rebiere H., Mazel B., Civade C., Bonnet P.A., Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography., *J Chromatogr B.*, 2007, 850, 376-383.
5. Colombo S., Beguin A., Telenti A., Biollaz J., Buclin T., Rochat B., Decosterd L.A., Intracellular measurements of anti-HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir,

- efavirenz and nevirapine in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B.*, 2005, 819, 256-276.
6. D'Avolio A., Siccardi M., Sciandra M., Lorena B., Bonora S., Trentini L., Perri G.D., HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients., *J Chromatogr B.*, 2007, 859, 234-240.
 7. DiFrancesco R., DiCenzo R., Vicente G., Donnelly J., Martin T.M., Colon L.A., Schifito G., Morse G.D., Determination of lopinavir cerebral spinal fluid and plasma ultrafiltrate concentrations by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry., *J Pharm Biomed Anal.*, 2007, 44, 1139-1146.
 8. ter Heine R., Rosing H., van Gorp E.C.M., Mulder J.W., van der Steeg W.A., Beijnen J.H., Huitema A.D.R., Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry., *J Chromatogr B.*, 2008, 867, 205-212.
 9. Temghare G.A., Shetye S.S., Joshi S.S., Rapid and sensitive method for quantitative determination of lopinavir and ritonavir in human plasma

by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *E-J.Chem.*, 2009, 6(1), 223-230.

10. Ehrhardt M., Möck M., Haefeli W.E., Mikus G., Burhenne J., Monitoring of lopinavir and ritonavir in peripheral blood mononuclear cells, plasma, and ultrafiltrate using a selective and highly sensitive LC/MS/MS assay., *J Chromatogr B.*, 2007, 850, 249-258.
11. Notari S., Mancone C., Tripodi M., Narciso P., Fasano M., Ascenzi P., Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF., *J Chromatogr B.*, 2006b, 833, 109-116.
12. Sulebhavikar A.V., Pawar U.D., Mangoankar K.V., Prabhu-Navelkar N.D., HPTLC methods for simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in capsule dosage form., *E-J. Chem.*, 2008, 5(4), 706-712.
13. Azoulay S., Nevers M.C., Créminon C., Heripret L., Garraffo R., Durant J., Dellamonica P., Grassi J., Guedj R., Duval D., An enzyme immunoassay for the quantification of plasma and intracellular lopinavir in HIV-infected patients., *J Immunol Methods.*, 2004, 295, 37-48.
14. Lavine B., Workman J., Chemometrics., *Anal Chem.*, 2008, 80, 4519-4531.
15. Einax J.W., Chemometrics in analytical chemistry., *Anal Bioanal Chem.*, 2008, 390, 1225-1226.

16. Dinte E., Tomuta I., MUT E.M., Iovanov R.I., Leucuta S.E.,
Chemometric methods for the simultaneous assay of chloramphenicol,
chlorhexidine and metronidazole during *in vitro* dissolution of drugs
from mucoadhesive buccal gels., *FARMACIA.*, 2010, 58(5), 572-582.
17. Phechkrajang C.M., Thin E.E., Sratthaphut L., Nacapricha D., Wilairat
P., Quantitative determination of lopinavir and ritonavir in syrup
preparation by liquid chromatography, *Mahidol University Journal of
Pharmaceutical Sciences.*, 2009, 36(1-4), 1-12.
18. Hemmateenejad B., Rezaei Z., Khabnadideh S., Saffari M., A
comparative study between PCR and PLS in simultaneous
determination of diphenyl amine, aniline and phenol:Effect of
wavelength selection., *Spectrochimica Acta Part A.*, 2007, 68. 718-
724.

Simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in plasma by first derivative and chemometrics-assisted spectrophotometry and comparison with reference method

S. Jarusintanakorn¹, K. Sripha¹ and C. Phechkrajang^{1*}

¹ Faculty of Pharmacy /Department of Pharmaceutical Chemistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

First derivative spectrophotometry and two models of chemometrics, principal component regression (PCR) and partial-least squares (PLS-1) assisted with chemometrics programs (Multivar and Unscrambler®), were developed for resolving the problem of overlapping spectra of lopinavir (LPV) and ritonavir (RTV) and proposed to simultaneously determine both drugs in human plasma. The zero-crossing technique with first-order spectra was applied and offered the wavelength at 228 and 254 nm as suitable wavelength for the investigation of LPV and RTV in plasma, respectively. The mean recovery of RTV in plasma obtained from this method was not significantly different with HPLC method which was contrary with LPV results. In case of chemometrics methods, both PCR ($\lambda = 240 - 279$ nm, PCs 13) and PLS-1 ($\lambda = 240 - 279$ nm, PCs 8) models provided no significant difference of the mean recovery of RTV in plasma with HPLC. In addition, PLS-1 model achieved from the wavelength between 215 – 249 nm with PC 9 presented the optimal model for LPV determination in plasma which was comparable with HPLC method.

Keywords: Lopinavir; Ritonavir; First derivative; Chemometrics; PCR; PLS-1

1. Introduction

The HPLC (high-performance liquid chromatography) method is the favorite method for simultaneous determination of drugs in plasma, but this method has some disadvantages such as time consuming, high cost and sample clean-up. UV-Vis spectroscopy is the simplest and fast method including less step of sample pretreatment. However, classical univariate calibration has limitation in the complex mixture especially in case of overlapping spectral characteristics occurring. In recent years, derivative and chemometrics techniques have been available in order to overcome above the limitation and used for simultaneous determination drugs in biological fluids. Derivative spectrophotometry is the method which involves mathematical transformation of zero-order spectra to higher-order spectra (i.e. first, second, third and fourth). The wavelength that shows derivative signal of interesting analyte and zero value of other compounds was selected as suitable wavelength in accordance with

zero-crossing technique. In case of chemometrics method, principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR) are involved analysis two or more variables at a time which provide better results comparing using classical spectrophotometry. In this study, lopinavir (LPV) and ritonavir (RTV) which are protease inhibitors which were mostly investigated by chromatographic methods were selected to study the possibility of simultaneous determination of both drugs in plasma samples by using first derivative spectrophotometry and chemometrics with PCR and PLS-1 models and compared with HPLC method.

2. Experimental

2.1 Reagents

All standard drugs were kindly donated from GPO Thailand. Reagent grade of hexane and ethyl acetate were taken from J.T. Baker. HPLC grade of acetonitrile and methanol were purchased from Labscan. Sodium dihydrogen phosphate was taken from Merck.

2.2 Apparatus and software

The UV absorbance data was recorded by a PerkinElmer (Lambda 35) UV-Visible spectrophotometer combined with a 10 mm quartz cell and the UV winlab software was used for manipulation of spectral data. The chromatographic system composed of Shimadzu LC-10AD, CBM-10A (system controller) and a SPD-10V UV-Vis detector. Hypersil Gold C18 (250 x4.6 mm i.d., 5 μ m) was supplied by Thermo Scientific (USA). A 1.73 GHz Intel personal computer with Window XP operating system was used for the calculation of PCR and PLS model with Multivar (version 7) and Unscrambler® (version 9.8) programs and the other statistical analysis.

2.3 Procedures

2.3.1 Preparation of stock standard solution and standard mixture solution

Stock solutions of LPV (1 mgmL⁻¹) and RTV (0.5 mgmL⁻¹) were prepared by dissolving the amount of each drug in methanol. The proper dilutions from each stock solution were performed in 50% methanol for the preparation of standard mixture solutions which used in the further experiment.

2.3.2 Preparation of plasma sample and extraction

Each plasma sample was prepared by spiking 100 μL of desired standard mixture solution in 400 μL of drug-free blank plasma. Then liquid-liquid extraction was utilized for removing any interference from plasma samples before analysis. Plasma sample and organic solvent were mixed and centrifuged 3000 rpm for 15 minutes. The organic layer was transferred to cleaned tube and evaporated under nitrogen at 50°C in a water bath. The extract was reconstituted by adding 2 mL of 50% methanol and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and 1.5 mL of supernatant was taken to analysis. After sample clean-up, the samples were filtered with nylon membrane filter for HPLC method.

Since plasma samples were diluted following the above extraction step, so the concentrations in plasma before extraction were 4 times to the final concentrations which were used for calculation in this study. All concentrations of each drug in plasma were out of the therapeutic ranges (1, 2).

2.3.3 One component calibration

In order to find linear concentration range of each drug, one component calibration was performed. Different volumes of working standard solution of each drug were prepared to desire concentration with 50% methanol. The absorbance spectra were recorded over the 200 – 400 nm using 50% methanol as blank.

2.3.4 Derivative spectrophotometry

Plasma samples composed of LPV ($2 - 12 \mu\text{gml}^{-1}$) and RTV ($1 - 6 \mu\text{gml}^{-1}$) were prepared and used to measure absorbance at wavelength between 200 – 400 nm against 50% methanol. Then, UV winlab program was utilized for transformation of zero-order to first-order spectra with Cubic-Golay Savitsky smoothing strategy.

2.3.5 Chemometrics method

Two sets of standard LPV and RTV which were within linear dynamic range spiked in plasma sample were prepared. The one set was calibration set which consisted sixteen mixtures in plasma and four blank plasma samples. Another was validation set which contained 10 mixtures in plasma. The composition in calibration set was selected based on central composite design (CCD) (3, 4) while the composition in validation set was obtained randomly. The absorbance data of all spectra collected at the wavelength between 200 – 400

nm were mean-centered and employed with Multivar and Unscrambler® program for calibration model building.

2.3.6 HPLC method

The HPLC method was applied for determination of LPV and RTV in human plasma using IDV as internal standard. The concentrations which used in this method were covered the linear range in spectrophotometry method, 1 – 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for LPV and 0.5 – 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for RTV. The procedures of plasma sample preparation and extraction were similar as aforementioned, a 20 μL aliquot of samples was injected to HPLC column. The HPLC condition comprising acetonitrile/phosphate buffer pH 6 (50/50) with C18 column at a flow rate 1 mL min^{-1} was developed and validated. The absorbance was measure at 254 nm.

3. Results and discussion

From the zero-order spectra (Fig. 1(a)), it was possible to analyze RTV in a presence of LPV but it was not possible to analyze LPV in a presence of RTV. Therefore, the zero-crossing technique with first derivative spectrophotometry (Fig. 1(b)) was necessary to permit a more selective identification and analysis of two drugs in mixture at a time. On the other hand, the overlapped spectra of both drugs could be examined by using chemometrics methods such as principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR).

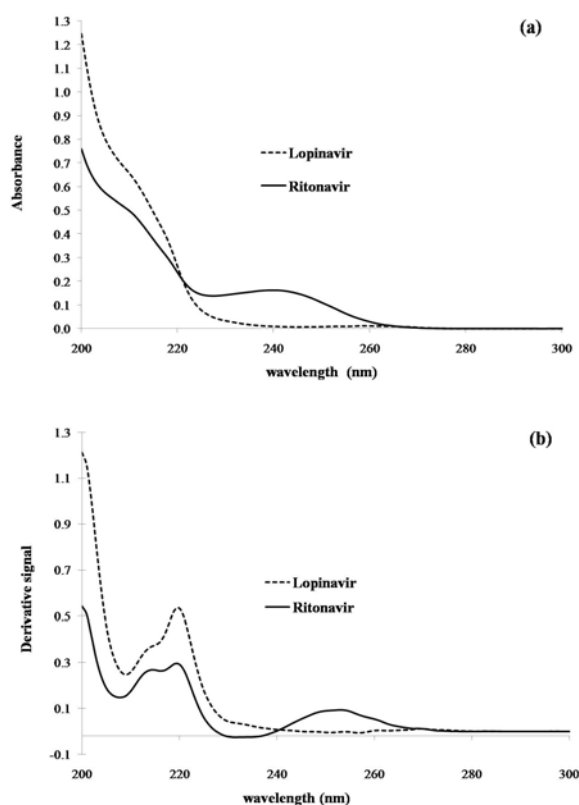


Fig. 1 (a) Zero-order spectra and (b) first derivative spectra of LPV $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ and RTV $6 \mu\text{g mL}^{-1}$

3.1 Derivative spectrophotometry

In order to obtain the best results, the number of points for smoothing spectra and $\Delta\lambda$ for differentiation of spectra were necessary to optimize. A cubic Golay-Savitsky smoothing of 6 points and $\Delta\lambda$ of 5 nm provided the best signal-to-noise ratio. The wavelength at 228 nm and 254 nm of first-order spectra (Fig. 1(b)) were selected based on zero-crossing technique for the determination of LPV and RTV, respectively. The linearity, accuracy and precision parameters were evaluated in accordance with the bioanalytical method validation guideline (5) by using plasma samples containing of $2 - 12 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPV and $1 - 6 \mu\text{g mL}^{-1}$ of RTV. The results showed that the linear relationship between derivative signal and its concentration for RTV determination showed good linear response which indicated by correlation coefficient ($R^2 = 0.9915$) while the linearity parameter for LPV was not met the requirement of the guideline ($R^2 = 0.7375$). Because the wavelength at 228 nm used for LPV determination possessed slope characteristic which the error of measuring derivative signal was occurred easily. In addition, it was seen that the recovery results obtained from the determination of plasma sample containing of 3, 7 and $11 \mu\text{g mL}^{-1}$ of LPV and 1.5, 3.5 and $5.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of RTV provided the good accuracy and precision only for RTV determination in plasma samples (Table 1).

Table 1: The results of accuracy and precision for LPV and RTV determination by first derivative spectrophotometric method

Drug	Accuracy ^a	Repeatability ^b	Inter-day Precision ^c
LPV	31.19 – 44.70	7.11 – 37.86	40.34 – 52.70
RTV	95.01 – 113.74	4.94 – 10.05	4.65 – 6.99

^a The accuracy presented as percentage of mean recovery (n=5).

^b Repeatability present as %RSD (relative standard deviation) (n = 5).

^c Inter-day precision present as %RSD (n = 5).

3.2 PCR and PLS-1 modeling

The resulted univariate calibrations for the analytes were linear in the ranges of 2-20 µg/mL for lopinavir and 1-6 µg/mL for ritonavir (Figure 2). The concentrations of LPV and RTV in the calibration set obtaining from central composite design (CCD) and validation set obtaining from random selection were within the linear dynamic range (0 – 16 µgmL⁻¹ for LPV and 0 – 4 µgmL⁻¹ for RTV). Individual analytes were independently modeled by PCR and PLS-1 with optimum wavelength region and number of principal components (PCs) or factors. Because of using any wavelengths contained the absorption of solvent and other analytes for model building, resulting in the poor predictive ability of calibration model. Therefore, the selection wavelength range was critical step for acquiring the optimal calibration model. In addition, number of principal components (PCs) with suitable wavelength region was also needed to optimize. In this study, the leave-one-out cross-validation was applied by localization of the minimum PRESS (prediction error of sum squares) for obtaining of optimal wavelength range and number of PCs according to moving window strategy with spectral information and Haaland and Thomas criteria, respectively.

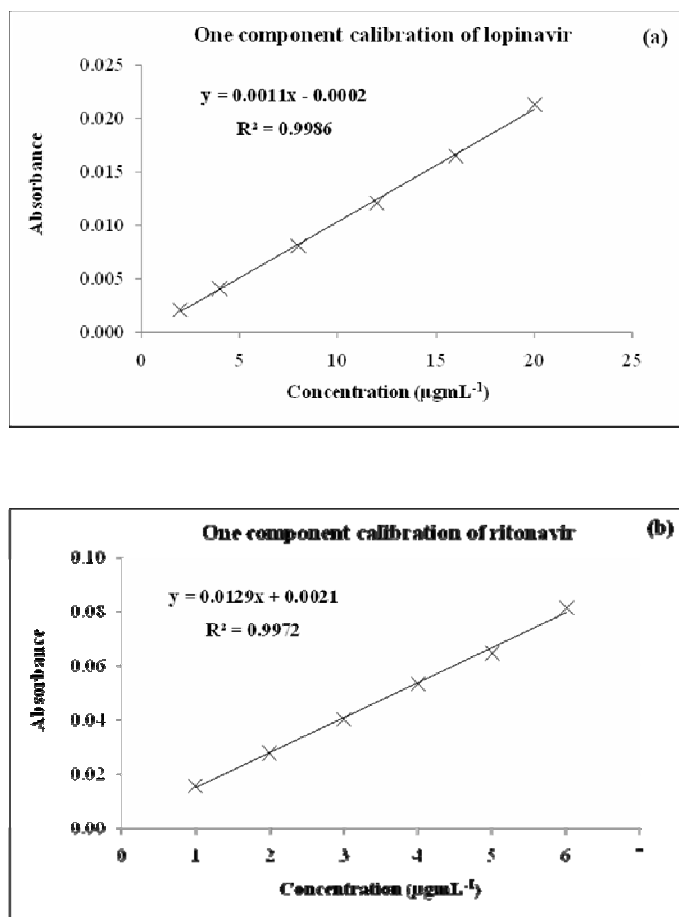


Fig. 2 (a) One component calibration curve of (a) LPV and (b) RTV

From the spectra of LPV and RTV in Fig. 1(a), the meaningful wavelength regions which presented individual absorption of interested component without solvent effect for LPV and RTV were 210 – 260 nm and 230 – 280 nm, respectively. These ranges were applied to wavelength selection in Multivar for obtaining suggested wavelength region and moving window strategy in Unscrambler®. A minimum window of 5 sensors was employed with starting wavelength (210 and 215 nm for LPV determination and 230, 235 and 240 nm for RTV determination) for model building by calculation of PCR and PLS-1 methods. For each wavelength range, the F -statistic based on the Haaland and Thomas criterion was applied to avoid the overfitting results for choosing the optimal number of PCs which corresponding to a probability of less than 75%. In calibration step, some statistical parameters such as the root mean square difference (RMSD), the correlation coefficient (r^2) and the relative error of the prediction (REP) were computed for comparing between models. In addition, the independent set of plasma samples containing different composition of LPV and RTV was employed in order to evaluate the proposed calibration model. The one statistical parameter which is expressed the predictive applicability of a regression model was

standard error of prediction (SEP). All relevant statistical parameters of optimal PCR and PLS-1 models for LPV and RTV determination were acceptable for all proposed calibration models as shown in Table 2.

On the other hand, the proposed models were validated in terms of linearity, accuracy and precision in order to show that these chemometrics methods were appropriate to investigate LPV and RTV in plasma samples by using different concentration of LPV and RTV spiked in plasma. From Table 3, it was seen that all parameters were met the requirement of Bioanalytical method validation guideline.

Table 2: The statistical parameter values for the optimum PCR and PLS-1 models of LPV and RTV

Parameters ^a	LPV				RTV	
	PCR		PLS-1		PCR	PLS-1
	Multivar	Unscrambler®	Multivar	Unscrambler®		
Spectral range (nm)	210 – 249	205 – 224	215 – 259	215 – 249	240 – 279	240 – 279
PCs	12	4	11	9	13	8
PRESS	0.4955	2.5248	0.1292	0.3813	0.0350	0.0213
RMSD	0.1760	0.3972	0.0899	0.1544	0.0468	0.0365
r^2	0.9981	0.9904	0.9995	0.9986	0.9977	0.9986
REP (%)	2.20	4.95	1.12	1.93	2.33	1.82
SEP	0.3380	0.3762	0.3118	0.3324	0.2095	0.2144

$$\begin{aligned}
 \text{PRESS} &= \sum_{i=1}^N (C_i - \hat{C}_i)^2 & \text{RMSD} &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - \hat{C}_i)^2}{N}} & r^2 &= 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (C_i - \hat{C}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (C_i - \bar{C})^2} \\
 \% \text{ REP} &= \frac{100}{\bar{C}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - \hat{C}_i)^2}{N}} & \text{SEP} &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n-1}}
 \end{aligned}$$

where C is the actual concentration, $\hat{C}$ is the predicted concentration and $\bar{C}$ is the average concentration, N is total number of calibration samples and n is total number of validation set.

Table 3: The validation results for LPV and RTV when applying PCR and PLS-1 models^a

Parameters ^a	LPV				RTV	
	PCR		PLS-1		PCR	PLS-1
	Multivar	Unscrambler®	Multivar	Unscrambler®		
Spectral range (nm)	210 – 249	205 – 224	215 – 259	215 – 249	240 – 279	240 – 279
PCs	12	4	11	9	13	8
Linearity	0.9992	0.9990	0.9971	0.9973	0.9980	0.9975
Accuracy	103.97	103.34	103.58	104.60	95.72	96.09
Repeatability	3.33	3.01	3.16	3.33	6.38	5.85
Inter-day precision	3.33	2.44	2.60	2.85	3.73	4.73

^a Linearity present as correlation coefficient (R^2), the accuracy present as average of % recovery (n=15). For precision present as %RSD (relative standard deviation) composed of repeatability (n=15) and inter-day precision (n = 5).

3.3 Comparison of the results of derivative spectrophotometry, chemometrics with HPLC

HPLC condition used in this study was optimized and validated in terms of system suitability, linearity, accuracy and precision (Data were not shown here) in order to apply as reference method for comparison the mean recovery of LPV and RTV investigation in human plasma with first derivative and chemometrics methods. Mean recovery results of LPV and RTV spiked in plasma which were obtained from first derivative spectrophotometric, chemometrics and HPLC methods are presented in Tables 4 and 5, respectively. The mean recovery of each method was compared by using *t*-statistic with confidence interval of 95% which the first derivative and chemometrics methods were comparable with HPLC for RTV determination in plasma. In case of LPV determination, only PLS-1 models obtained from PC9 with spectral range between 215 – 249 nm provided no significant difference between the results with HPLC method.

Table 4

Percent of recovery results for LPV spiked in plasma obtaining from PCR and PLS-1 methods compared with HPLC method

Added concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	HPLC	PCR		PLS-1	
		Multivar	Unscrambler®	Multivar	Unscrambler®
2.0	96.94	105.50	112.00	99.00	111.01
3.2	105.29	99.38	100.31	100.94	104.06
3.2	104.85	103.13	113.44	97.81	103.68
4.0	111.16	97.75	101.25	100.25	101.59
6.0	105.86	88.50	93.33	94.00	93.09
8.0	107.10	99.50	90.25	100.88	101.77
10.0	106.11	101.00	101.00	102.00	102.40
10.0	106.16	101.00	100.00	98.60	101.68
12.0	107.81	104.17	102.50	101.67	104.44
12.0	106.11	104.17	103.33	103.33	104.93
Average	105.74	100.41	101.74	99.85	102.87
%RSD	3.37	4.85	6.98	2.65	4.29

Table 5

Percent of recovery results for RTV spiked in plasma obtaining from PCR and PLS-1 methods compared with HPLC method

Added concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	HPLC	First derivative	PCR		PLS-1	
			Multivar	Unscrambler®	Multivar	Unscrambler®
3.6	89.80	95.28	100.28	100.34	100.00	100.13
2.0	97.87	96.50	98.50	98.31	97.50	97.71
4.0	92.94	95.64	91.50	91.47	90.75	90.86
1.0	95.86	95.35	102.00	102.26	99.80	99.82
3.6	96.32	110.47	113.61	113.69	113.61	113.71
2.0	96.41	99.42	96.50	96.62	98.00	98.17
1.0	100.26	98.84	89.40	89.37	91.30	91.32
2.4	98.37	112.40	94.58	94.64	94.58	94.52
1.2	97.71	86.24	100.00	100.01	100.00	100.03
1.6	98.57	93.02	95.63	95.62	94.38	94.35
Average	96.41	98.32	98.20	98.23	97.99	98.06
%RSD	3.15	7.95	6.83	6.86	6.61	6.63

4. Conclusions

In this study, the developed first derivative spectrophotometry with zero-crossing technique was not successful for LPV determination spiked in plasma. However, this method could be used to investigate RTV in a presence of LPV in plasma samples and was comparable with HPLC method. On the other hand, PCR and PLS-1 models were optimized and validated for simultaneous determination of both drugs spiked in plasma. Only PLS-1 model acquired from wavelength between 215 – 249 nm with PC 9 provided no significant difference of LPV results with HPLC method. Additionally, RTV recovery obtained from all aforementioned optimal PCR and PLS-1 models were not significantly different from HPLC method. Even the concentrations of LPV and RTV used in this study were out of range in pharmacokinetic profiles, but the simple and rapid methods as derivative and chemometrics methods have been very useful for the simultaneous determination of binary analytes in plasma samples.

Acknowledgements

The authors would like to thank The Thailand Research Fund (MRG5280225) for financial support and the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of pharmacy, Mahidol University for research facilities.

References

- [1] Ofotokun I, Chuck SK, Binongo JN, Palau M, Lennox JL, Acosta EP. Lopinavir/ritonavir pharmacokinetic profile: Impact of sex and other covariates following a change from twice-daily to once-daily therapy. *J Clin Pharmacol*. 2007;47:970-7.
- [2] Rosso R, Di Biagio A, Dentone C, Gattinara GC, Martino AM, Viganò A, et al. Lopinavir/ritonavir exposure in treatment-naïve HIV-infected children following twice or once daily administration. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:1168-71.
- [3] Brereton RG. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester: Wiley; 2002.
- [4] Esbensen KH. *Multivariate data analysis - In practice*. 5th ed.: CAMO process AS; 2004.
- [5] Guidance for industry: Bioanalytical method validation 2001. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); [cited 22/8/2007]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.