

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ТЕМОЗОЛОМИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

Г.В. Раменская, И.Е. Шохин,
Т. Н. Комаров, Ю. В. Медведев,
Е. Ю. Мидруев, Т. А. Ярушок

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М.Сеченова Минздрава
России

Разработана методика определения противоопухолевого препарата темозоломида в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Пробоподготовку проводили путем осаждения белков 50 % раствором трифторуксусной кислоты. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность. Аналитический диапазон методики составил составил 0,1 мкг/мл –10 мкг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов темозоломида, а также для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

Введение

Онкологические заболевания второе место по распространённости в мире (в т.ч. и в Российской Федерации) после сердечно-сосудистых [1]. Одной из тяжелейших форм рака кожи является меланома — злокачественное заболевание, характеризующееся быстрым ростом опухолевой ткани.

Одним из наиболее эффективных и современных средств для лечения злокачественной меланомы является темозоломид — препарат, разработанный в конце XX века учёными из Университета Астона (Бирмингем, Великобритания) [2]. Терапевтический эффект темозоломида, являющегося пролекарством, обусловлен способностью его основного метаболита дакарбазина метилировать остатки гуанина в структуре ДНК опухолевой клетки [3]. Препарат показал высокую эффективность при лечении первичной злокачественной меланомы, в настоящее время проводятся исследования, направленные на изучение возможности применения терапии препаратами темозоломида при лечении рака мозга, злокачественной лимфомы и ангиобластомы [4].



Вышеизложенные факты формируют повышенный интерес к препаратам темозоломида не только у врачей-онкологов, но также и у производителей лекарственных средств. В настоящее время препараты темозоломида включены правительством РФ в "Список жизненно-необходимых и важнейших лекарственных препаратов" на 2012 и 2013 годы [5], а также в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть налажено на территории РФ к 2014 г. [6].

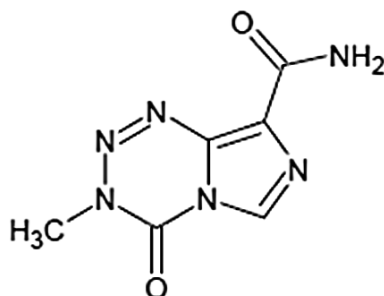


Рисунок 1. Структурная формула темозоломида.

В основе темозоломида лежит сложная гетероциклическая структура, поэтому данный препарат стабилен только в кислой среде. При смещении pH среды в сторону щелочных значений препарат превращается в свой основной метаболит – МТИС. В связи с этим для проведения фармакокинетических исследований препаратов темозоломида необходимо соблюдение определённых условий консервирования образцов плазмы (немедленное прибавление раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты или 8,5 % фосфорной кислоты в количестве 50-100 мкл в отобранные пробы плазмы крови), проведения пробоподготовки и хроматографирования. Среди опубликованных методов количественного определения темозоломида в плазме крови приведены методы жидкостной хроматографии с УФ-детектором или диодно-матричным детектором, предел количественного обнаружения 100-200 нг/мл [7,8] и жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием, предел обнаружения 2-20 нг/мл [9,10]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для сравнительных фармакокинетических исследований препаратов темозоломида (ожидаемый диапазон концентраций темозоломида в плазме крови для исследований биоэквивалентности после однократного приема составляет около 0,1 – 8 мкг/мл) [10].

Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1290 градиентный насос	G4220A
1290 термостат колонок	G1316C
1290 автосамплер	G4226A
1290 диодно-матричный детектор	G4212A

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 250 x 4,6 мм 5 мкм
Предколонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5 x 4,6 мм 5 мкм
Температура колонки	25 °C
Подвижная фаза	вода, подкисленная трифторуксусной кислотой до pH 2,5 и метанол (90:10)
Скорость потока подвижной фазы	1 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл
Детектирование	длина волны 316±4 нм с записью спектра в диапазоне 200-400 нм
Время хроматографирования одной пробы	12 минут
Время удерживания темозоломида	около 9 минут

Программное обеспечение

ChemStation (ver. A.01.04.122), Agilent Technologies

Растворы и реактивы

Темозоломид, субстанция-порошок (99,9 % основного вещества); метанол (gradient grade, J.T. Baker, Голландия); трифторуксусная кислота (ТФУ) (х.ч.); кислота хлороводородная (х.ч.); вода Milli-Q; вода очищенная.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре от – 45 до – 50 °C. Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 °C.

Исходный раствор темозоломида кислоты готовили путём растворения навески субстанции-порошка темозоломида в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты и хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 °C. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора 0,1 М раствором хлороводородной кислоты и использовали свежеприготовленными.

Пробоподготовка

Для пробоподготовки использовали шейкер типа “вортекс” Heidolph Reax Top (Германия); ультрацентрифугу Thermo Scientific SL16, EC. Взятие навесок осуществляли с помощью весов A&D GR-200 (Япония). Определение pH буферных растворов проводили при помощи pH/мВ-метра pH 330i, WTW (Германия). Дозирование реактивов и биоматериала по объёму осуществляли с помощью дозаторов Ленпипет Лайт 100-1000 мкл и 10-100 мкл. Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке.

В качестве способа пробоподготовки для плазмы было выбрано осаждение белков 50 % раствором ТФУ. Выбор ТФУ в качестве осаждающего реагента обусловлен более высокой осаждающей способностью реагента, а также стабильностью проб темозоломида в кислой среде. К 500 мкл исследуемой плазмы (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором темозоломида) в центрифужных пробирках типа “Eppendorf” вместимостью 1,5 мл прибавляли 250 мкл раствора ТФУ, встряхивали на шейкере в течение 20 с, далее центрифугировали в течение 10 мин при 15200 об/мин и отделяли 700 мкл надосадочной жидкости, которую переносили в вials для хроматографа.

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения темозоломида в плазме крови человека проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [11] и EMA [12], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного обнаружения.

Селективность

Для определения специфичности проводили анализ образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора темозоломида в диапазоне концентраций 0,1 мкг/мл – 10 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания темозоломида. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рисунках 2 и 2а.

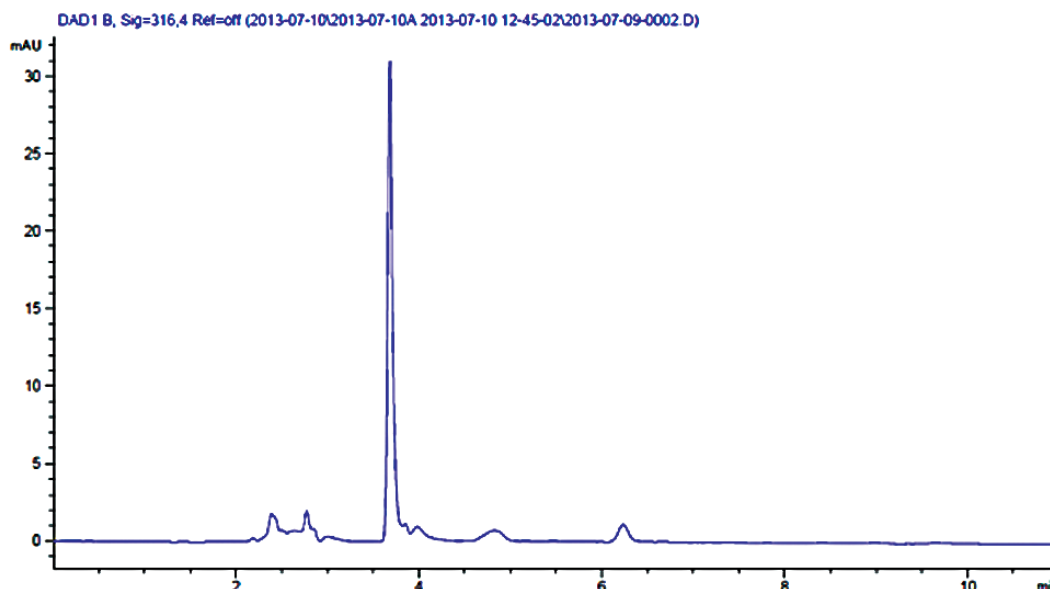


Рисунок 2. Хроматограмма образца чистой плазмы.

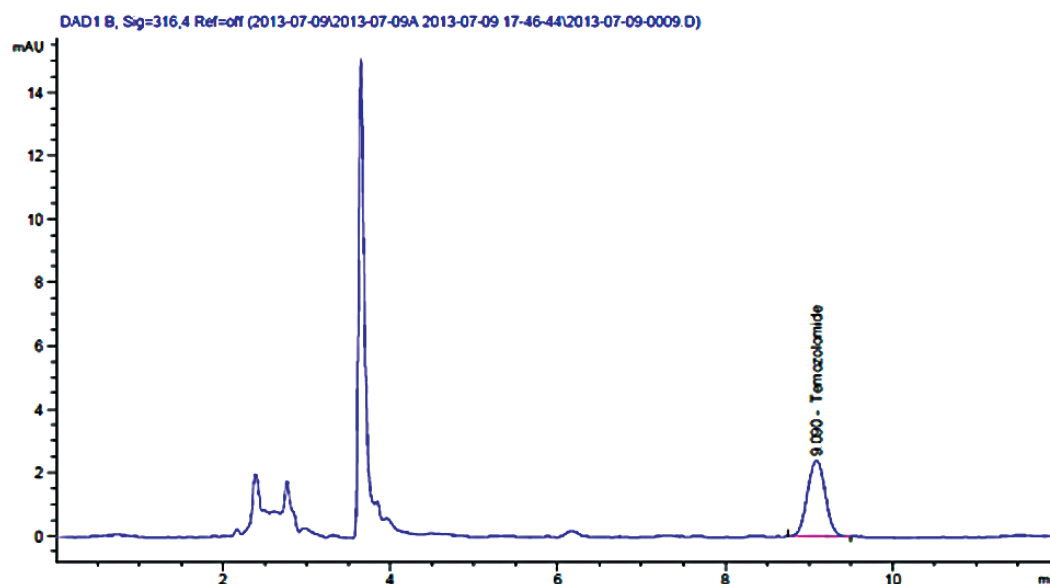


Рисунок 2а. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора темозоломида (0,4 мкг/мл).

Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки по пику темозоломида составила 7121 теоретических тарелок, фактор асимметрии составил 0,90.

Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора темозоломида до

получения концентраций: 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 10 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ($r^2 = 0,99997$), приведенный на Рис. 3, совместно с уравнением калибровочной кривой.

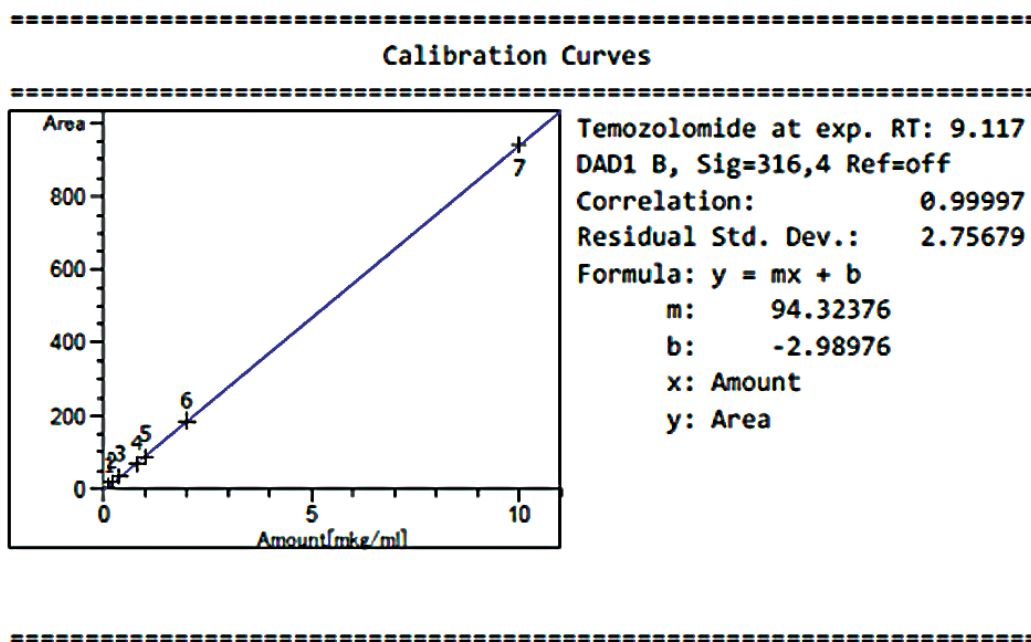


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости площади пика темозоломида от ее концентрации в плазме.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в Таблице 1.

Полученные отклонения соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек).

$C_{\text{факт}}$, мкг/мл	0,100	0,200	0,400	0,800	1,000	2,000	10,000
$C_{\text{рассчит}}$, мкг/мл	0,101	0,225	0,407	0,752	0,969	1,999	10,006
ϵ , %	1,0	-12,5	-1,7	6,0	-3,1	0,0	0,1
Норма	Не более 20 %		Не более 15 %				

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора темозоломида до получения концентраций: 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали по 3 раза. Исследование

проводили в течение 1-го дня (intra - day) и 2-го дня (inter-day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в Таблицах 2 и 3.

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=3)	S.D. (n=3)	RSD, % (n=3)	ϵ , %
0,10	0,10	0,109	0,01	8,62	9,00
	0,12				
	0,11				
1,00	0,97	0,968	0,00	0,18	-3,20
	0,97				
	0,97				
10,00	10,01	9,751	0,22	2,27	-2,49
	9,63				
	9,62				

Таблица 2. Правильность и прецизионность методики (intra-day).

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=6)	S.D. (n=6)	RSD, % (n=6)	ϵ , %
0,10	0,10	0,11	0,01	5,41	6,17
	0,11				
	0,10				
1,00	0,97	0,99	0,03	3,11	-1,27
	1,01				
	1,04				
10,00	10,00	9,86	0,19	1,91	-1,38
	10,01				
	9,92				

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики (inter-day).

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных двух концентраций).

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли согласно на основании данных линейности,

правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация темозоломида в плазме, для которой возможно количественное обнаружение темозоломида со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 0,1 мкг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 4.

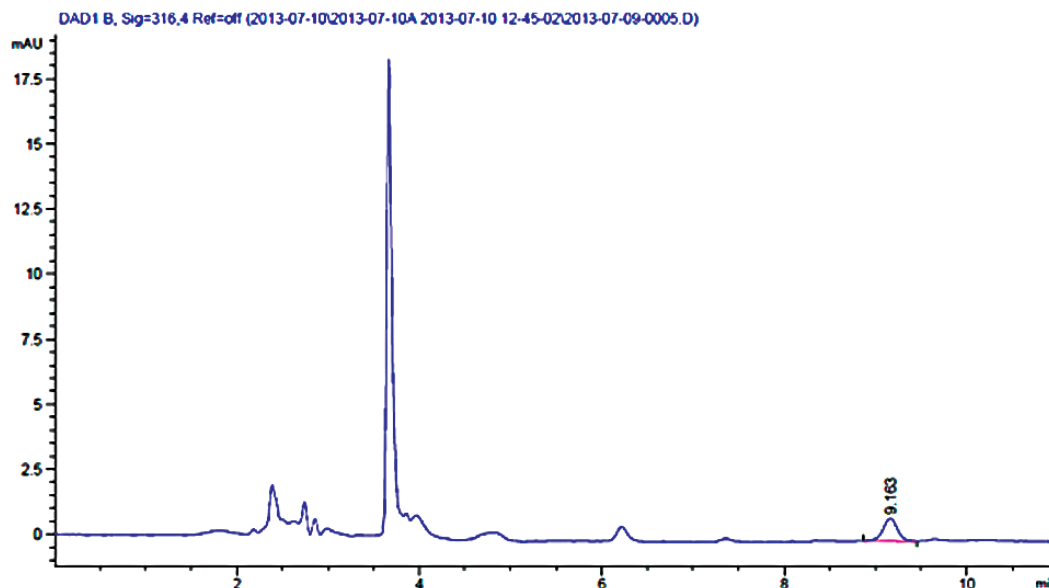


Рисунок 4. Хроматограмма плазмы с содержанием темозоломида на уровне ПК0.

Стабильность

Стабильность образцов была подтверждена для стандартных растворов темозоломида (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре 2-8 °С), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день), долговременная стабильность в течение 1 мес на уровнях концентраций 0,1 мкг/мл и 10 мкг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Выводы

Разработана методика количественного определения темозоломида в плазме крови человека методом ВЭЖХ с применением УФ-детектирования, обладающая достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения темозоломида в плазме крови с целью исследования фармакокинетики препаратов темозоломида, в том числе для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС. Методика была валидирована по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Список литературы

1. URL: <http://www.who.int/gho/en/> (дата обращения: 24.07.2013)
2. E.S. Newlands, M.F. Stevens. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials // *Cancer Treat. Rev.* 1997. Vol. 23. No. 1. P. 35-61.
3. F.V. Jacinto, M. Esteller. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend // *DNA Repair*. 2007. Vol. 6. No. 8. P. 1155-1160.
4. M.E. Hegi, W.P. Mason, M.J. Van Den Bent. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial // *Lancet Oncology*. 2009. Vol. 10. No. 5. P. 459-466.
5. Распоряжение Правительства РФ от 30 июля 2012 года «Об установлении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2013 год».
6. Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Утвержден распоряжением Правительства Российской Федерации от 6 июля 2010 г. N 1141-р г. Москва.
7. H. Kim, P. Likhari, D. Parker. High-performance liquid chromatographic analysis and stability of anti-tumor agent temozolomide in human plasma // *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2001. Vol. 24. P. 461-468.
8. F. Shen, L.A. Decosterd, M. Gander, M. Determination of temozolomide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction // *J.Chromatogr.B.* 1995. Vol. 667. P. 291-300.
9. S.K. Chowdhury, D. Laudicina, N.A. Blumenkrantz, LC/MS/MS method for the quantitation of MTIC (5-(3-N-methyltriazene-1-yl)-imidazole-4-carboxamide), a bioconversion product of temozolomide, in rat and dog plasma // *J.Pharm.Biomed.Anal.* 1999. Vol. 19. P. 659-668.
10. H.K. Kim, C.-C. Lin, D. Parker, J. Veals. High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazene-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma // *J.Chromatogr.B.* 1997. Vol. 703. P. 225-233.
11. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
12. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
<http://www.your-analytical-solution.com>

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in USA, September 1, 2013
5991-2996RURU

