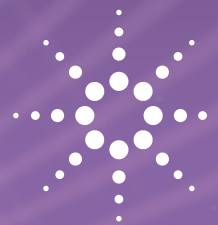


АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА КАПЕЦИТАБИНА И ЕГО АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА 5-ФТОРУРАЦИЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ЦЕЛЬЮ ПРОВЕДЕНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ



Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

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

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М.Сеченова Минздрава
России, 119991, Россия, г.
Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

* - адресат для переписки



Разработана методика определения противоопухолевого препарата капецитабина и его активного метаболита 5-фторурацила, используемого в химиотерапии различных онкологических заболеваний, в плазме крови человека методом ВЭЖХ с фотодиодноматричным детектором с целью проведения фармакокинетических исследований препаратов капецитабина. Пробоподготовку проводили путём жидкость-жидкостной экстракции. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность. Аналитический диапазон методики составил 0,1 мкг/мл—10 мкг/мл капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения клинических исследований, в том числе исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов капецитабина.

Введение

В настоящее время онкологические заболевания являются одними из самых распространённых заболеваний во всём мире [1]. Вместе с тем, в случае ранней диагностики злокачественных новообразований и своевременного назначения адекватного курса химиотерапии.

Одним из наиболее эффективных и современных препаратов для химиотерапии злокачественных опухолей является капецитабин. Основной химиотерапевтический эффект капецитабина, являющегося пролекарством, обусловлен способностью его основного метаболита — 5-фторурацила — ингибировать процесс деления ДНК, в результате чего, после внедрения в



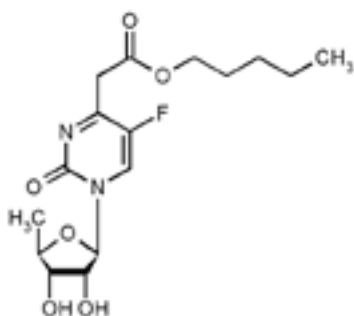


Рисунок 1. Структурная формула капецитабина

её структуру, образуется несовершенный фрагмент РНК, что не позволяет опухолевой клетке делиться и функционировать в дальнейшем [2]. Высокая биодоступность обуславливает широкое применение капецитабина в химиотерапии одних из наиболее распространённых форм рака — рака прямой кишки, рака молочной железы и рака желудка как индивидуально, так и в сочетании с другими препаратами, например, с препаратами тиса [3].

В настоящее время в Российской Федерации и за её пределами растёт спрос на препараты капецитабина. Капецитабин включён правительством РФ в “Список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов” на 2012 и 2013 годы [4], а также в перечень стратегически значимых ЛС, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации [5,6]. Основываясь на этом, можно заключить, что существует необходимость в разработке методики количественного определения капецитабина плазме крови с целью проведения фармакокинетических исследований, в том числе и исследований биоэквивалентности препаратов капецитабина.

В основе капецитабина лежит сложная фторированное производное урацила, являющееся активным метаболитом препарата, при этом активное действие обусловлено как капецитабином, так и 5-фторурацилом, поэтому существует необходимость при исследовании фармакокинетики препаратов капецитабина количественно определять как исходный препарат, так и его активный метаболит в биологических жидкостях [7]. Для оптимизации хроматографического анализа была поставлена цель разработать качественную методику для одновременного определения капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови.

Среди опубликованных методов количественного определения капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови приведены методы жидкостной хроматографии с УФ-детектором или диодно-матричным детектором, аналитический диапазон методик в среднем 25-4500 нг/мл [8] и жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (индуктивно-связанная плазма), предел количественного обнаружения для капецитабина — 1,4 нг/мл [9], для 5-фторурацила — 8 нг/мл, с tandemным масс-селективным детектором (тройной квадруполь), предел количественного обнаружения для капецитабина — 4 нг/мл, для 5-фторурацила — 8 нг/мл [10,11]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для сравнительных фармакокинетических исследований препаратов капецитабина. В то же время в публикациях [7] по определению капецитабина и 5-фторурацила методом ВЭЖХ с УФ-детектированием время анализа 1 пробы составляет 25-40 мин, что может быть критичным не только с точки зрения времени анализа, но и стабильности капецитабина, поскольку 1 аналитический цикл в фармакокинетических исследованиях подразумевает определение, как минимум, всех отобранных проб одного добровольца или пациента на обоих этапах фармакокинетического исследования. В связи с этим, опубликованные разработанные методики требуют дальнейшей доработки с целью применения их не только для терапевтического мониторинга, но и для фармакокинетических исследований.

Экспериментальная часть

Оборудование

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

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 250x4,6 мм 5 мкм
Предколонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5x4,6 мм 5 мкм
Температура колонки	20 °C
Подвижная фаза	вода, подкисленная трифторуксусной кислотой до pH 3,5, (А), и ацетонитрил (В) (градиентное элюирование)
Скорость потока	1 мл/мин
Объем вводимой пробы	10 мкл
Детектирование	длина волны 265±4 нм с записью спектра в диапазоне 200-400 нм
Время хроматографирования одной пробы	15 минут
Время выхода	5-фторурацила – около 3,5 мин, капецитабина – около 12 минут

Условия хроматографирования

Время, мин.	Количество компонента, %	
	А	В
0	81	19
3	81	19
3,1	35	65
11,5	35	65
11,6	81	19

Растворы и реактивы

5-фторурацил, субстанция-порошок (годен до 06.2014),
капецитабин, субстанция-порошок (годен до 06.2014);
метанол (gradient grade, J.T. Baker, Нидерланды);
трифторуксусная кислота (extra pure, Scharlau); кислота
хлороводородная (х.ч.); гексан (х.ч.), вода Milli-Q; вода
очищенная.

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

согласно СОП 1МГМУ-НИИФ-ЛР-005 «Пробоподготовка
биологических жидкостей (с экстракцией)».

Исходные растворы капецитабина и 5-фторурацила
готовили путём растворения навески стандарта в метаноле
и хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 оС.
Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения
исходного стандартного раствора водой.

Программное обеспечение

Agilent ChemStation ver. A.01.04.122

Пробоподготовка

В качестве способа пробоподготовки для плазмы была выбрана жидкость-жидкостная экстракция в гексан. Преимущество жидкость-жидкостной экстракции перед менее трудоёмким и затратным методом осаждения белков плазмы в данном случае обусловлен необходимостью получения более чистых проб, так как хроматографический анализ образцов проводился одновременно для количественного определения двух компонентов — нативного вещества и активного метаболита.

Для проведения пробоподготовки к 500 мкл плазмы крови прибавляли 50 мкл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты, 2,5 мл гексана, встряхивали на орбитальном шейкере в течение 10 минут, далее центрифугировали в течение 8 мин при 13000 об/мин. Переносили в вials для испарителя под током азота верхний (органический) слой и упаривали под током азота при 55 оС досуха. Получившийся сухой остаток перерастворяли в 500 мкл метанола, переносили в центрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл, центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 минут, после чего переносили надосадочную жидкость в микроvials для хроматографии.

Для пробоподготовки использовали шейкер типа “вортекс” Heidolph Reax Top (Германия); планетарный шейкер “Biosan” (Латвия), 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, 20-200 мкл и 10-100 мкл. Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке [12].

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидацию методики определения капецитабина и 5-фторурацила в плазме крови человека проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA и EMA [13, 14], а также Руководству по экспертизе лекарственных средств (ФГБУ «НЦ ЭСП», 2013) [15] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного обнаружения.

Селективность

Проводили анализ 6 образцов чистой плазмы, образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 5-фторурацила и капецитабина в диапазоне концентраций 0,1 мкг/мл — 10 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания 5-фторурацила и капецитабина. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 2 и 3.

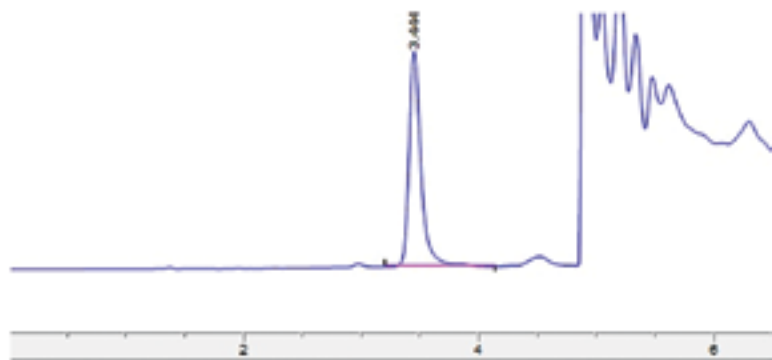


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора 5-фторурацила (10 мкг/мл)



Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора капецитабина (10 мкг/мл)

Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки число теоретических тарелок по пику 5-фторурацила – 6692; по пику капецитабина - 12639; фактор асимметрии для пика 5-фторурацила – 0,71; для пика капецитабина – 0,81.

Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартных растворов капецитабина и 5-фторурацила до получения концентраций: 0,1 мкг/мл; 0,2 мкг/мл; 0,5 мкг/мл; 1 мкг/мл; 2 мкг/мл; 5 мкг/мл и 10 мкг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики (для 5-фторурацила $r^2 = 0,99901$, для капецитабина - $r^2 = 0,99899$), приведенные на рис. 4-5.

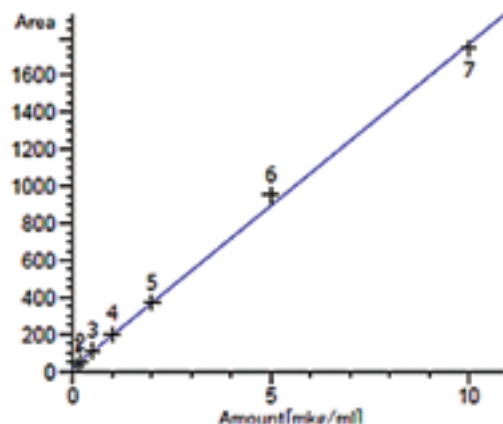


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости площади пика 5-фторурацила от его концентрации в плазме

This correction comment in the pdf i do not understand: “Please add the calibration curve for capecitabine (see original paper) and after that renumber the pictures”

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

фактических значений							
Код пробы	02 pl 0.5	02 pl 1	02 pl 2.5	02 pl 5	02 pl 10	02 pl 25	02 pl 50
5-фторурацил							
С _{факт} *, мкг/мл	0,1	0,2	0,5	1	2	5	10
С _{рассчит} *, мкг/мл	0,085	0,20	0,50	1,02	2,17	5,32	9,84
€, %	-14,2	0,11	0,11	1,89	8,19	6,61	-1,38
Норма, не более	20 %	15 %					
Капецитабин							
С _{факт} *, мкг/мл	0,1	0,2	0,5	1	2	5	10
С _{рассчит} *, мкг/мл	0,089	0,20	0,53	1,05	2,19	4,73	10,09
€, %	-10,9	0,13	6,03	5,02	9,51	-5,37	0,92
Норма, не более	20 %	15 %					

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

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

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением

стандартного раствора 5-фторурацила и капецитабина до получения концентраций: 0,1 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 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)	€, %
5-фторурацил					
0,1	0,119	0,118	0,01	0,48	17,66
	0,116				
	0,119				
1	1,139	1,130	0,02	0,89	13,01
	1,119				
	1,132				
10	10,211	10,217	0,02	0,10	2,16
	10,228				
	10,212				
Капецитабин					
0,1	0,109	0,107	0,01	5,40	6,66
	0,101				
	0,111				
1	1,04	1,027	0,01	0,57	2,66
	1,00				
	1,04				
10	10,25	10,173	0,05	0,61	1,74
	10,14				
	10,13				

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

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=3)	S.D. (n=3)	RSD, % (n=3)	€, %
5-фторурацил					
0,1	0,121	0,111	0,01	11,98	11,34
	0,109				
	0,085				
1	0,94	1,045	0,11	9,46	4,51
	0,92				
	1,02				
10	10,34	10,153	0,16	1,68	1,54
	10,11				
	9,82				
Капецитабин					
0,1	0,097	0,097	0,02	8,40	1,69
	0,104				
	0,090				
1	1,04	1,032	0,01	1,13	3,17
	1,02				
	1,05				
10	10,03	10,077	0,07	0,67	1,28
	10,10				
	10,10				

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

Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация 5-фторурацила и капецитабина в плазме, для которых возможно

определение 5-фторурацила и капецитабина со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 0,1 мкг/мл 5-фторурацила и капецитабина соответственно. Хроматограммы демонстрирующие ПКО методики, приведена на Рисунках 6 и 7.

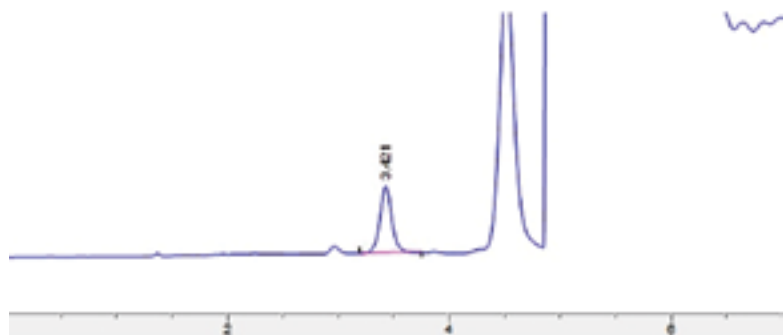


Рисунок 6. Хроматограмма плазмы с содержанием 5-фторурацила на уровне ПКО

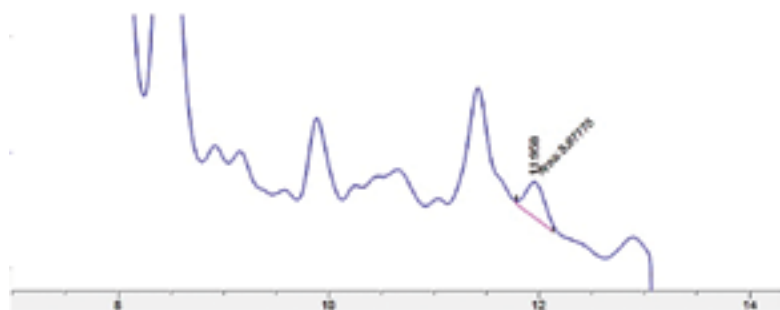


Рисунок 7. Хроматограмма плазмы с содержанием капецитабина на уровне ПКО

Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов 5-фторурацила и капецитабина (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре -40°C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$), на уровнях концентраций 0,1 мкг/мл и 10 мкг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пиков при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы на уровнях концентраций 1 мкг/мл и 10 мкг/мл помещены в морозильник при температуре -80°C на 1 мес. Площадь пиков при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Все исследования стабильности проводились в трех аликвотах.

Заключение

Разработана методика количественного определения капецитабина и его активного метаболита 5-фторурацила в плазме крови человека методом ВЭЖХ с применением УФ-детектирования, обладающая достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения концентраций препаратов в плазме крови с целью исследования фармакокинетики препаратов капецитабина, в том числе для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС, а также для проведения фармакокинетических исследований при индивидуальном подборе доз в персонализированной медицине. Методика была валидирована по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Список литературы

1. URL: <http://www.who.int/gho/en/>
2. Charles F; Armstrong, Lora L. /Lexi-Comp's Drug Information Handbook. 2004. 12th Edition. P.89-92
3. Fischer, David S; Knobf, M Tish /The Cancer Chemotherapy Handbook. 2003. 6th Edition. P.47.
4. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) на 2012 год. Утвержден Распоряжением Правительства РФ №2199-р от 7 декабря 2011 г.
5. Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Утвержден Распоряжением Правительства РФ №1141-р от 6 июля 2010 г.
6. Приказ «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года». Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. — М., 2009 г.
7. Шохин И.Е., Раменская Г.В., Медведев Ю.В., Шамаль Л.Л. / Разработка и регистрация лекарственных средств. 2011. 1(1). С. 46-52.
8. L. Zufia, A. Aldaz, J. Giráldez /Journal of Chromatography B. 2004. 809. P.51—58.
9. Yan Xu, Jean L. Grem /Journal of Chromatography B. 2003. 783. P.273—285.
10. Maarten J. Deenen, Hilde Rosing, Michel J. Hillebrand / Journal of Chromatography B. 2013. 913— 914. P.30— 40.
11. Sylvie M. Guichard, Iain Mayer, Duncan I. Jodrell /Journal of Chromatography B. 2005. 826. P.232—237
12. Государственный реестр средств измерений. URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx
13. 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.
14. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.
15. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. / М.: Гриф и К, 2013.

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, November 1, 2013
5991-3524RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies