

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА СВЕРХВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

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

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



Разработана методика определения противоопухолевого препарата иматиниба, используемого в химиотерапии онкологических заболеваний, в плазме крови человека методом СВЭЖХ с фотодиодноматричным детектором с целью проведения фармакокинетических исследований препаратов иматиниба. Пробоподготовку проводили методом осаждения белков раствором ТФУ. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность. Аналитический диапазон методики составил 50-2000 нг/мл иматиниба в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения клинических исследований, в том числе исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов иматиниба.

Введение

В современное время одним из наиболее актуальных вопросов является создание эффективных и безопасных способов лечения онкологических заболеваний [1].

Для лечения хронического миелолейкоза и злокачественных опухолей ЖКТ широко применяется препарат иматиниб. Механизм действия препарата заключается в необратимом блокировании фермента тирозинкиназы, связанного с "филадельфийской" хромосомой, подавляет пролиферацию и вызывает апоптоз опухолевых клеток [2]. В настоящее время препарат включён правительством РФ в «Список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов» на 2012 и 2013 годы [3], а также в перечень стратегически значимых ЛС, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации [4,5]. На основании данных документов



можно заключить, что существует необходимость в разработке качественной и эффективной методики количественного определения иматиниба в плазме крови с целью проведения фармакокинетических исследований, в том числе и исследований биоэквивалентности препаратов иматиниба.

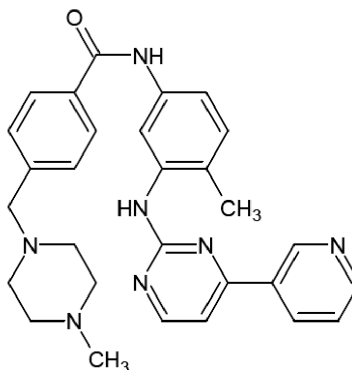


Рисунок 1. Структурная формула иматиниба.

В основе иматиниба лежат несколько гетероциклических азотсодержащих структур. Несмотря на наличие в структуре амидной группировки, препарат достаточно устойчив в кислой среде, что позволяет использовать в качестве пробоподготовки метод осаждения белков с помощью ТФУ.

Для количественного определения иматиниба в плазме и сыворотке крови применяются методы ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием [6-8], линейный диапазон исследуемых концентраций для данных методик составляет 200-2500 нг/мл, ВЭЖХ с масс-селективным детектированием [9]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований иматиниба. В качестве пробоподготовки применяют методы жидкость-жидкостной экстракции, твердофазной экстракции и осаждение белков.

Для повышения эффективности исследования, а также в связи с необходимостью исследования большого числа проб одновременно, было решено использовать метод сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Данный метод характеризуется большей эффективностью хроматографического разделения, а также уменьшения время анализа за счёт уменьшения размера частицы сорбента (менее 3 мкм), а, следовательно, и размеров самой колонки. Кроме того, данный метод позволяет повысить селективность и чувствительность методики. Поскольку побочным эффектом при уменьшении размера сорбента является повышение давления, следует отметить необходимость использования принципиально иного оборудования, способного выдерживать давление до 1500 бар, а также обладающего высокой точностью подачи растворителя при высоком давлении. Кроме того, при проведении биоаналитических исследований видится невозможным снижение времени анализа менее чем до 4-5 минут, т.к. в случае определения вещества в плазме крови приходится сталкиваться с так называемыми неудерживаемыми компонентами плазмы, время выхода которых составляет 0-4 мин и не зависит от размера частиц сорбента и, собственно, колонок. Тем не менее, метод СВЭЖХ, очевидно, является перспективным для исследования биоэквивалентности и определения концентрации веществ в плазме при проведении лекарственного мониторинга [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	Poroshell 3 x 100 мм x 2,7 мкм
Предколонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5 x 4,6 мм 5 мкм
Температура колонки	40 °C
Подвижная фаза	50 мМ фосфатный буфер pH 2,50 – ацетонитрил (79:21)
Скорость потока подвижной фазы	0,9 мл/мин
Объем вводимой пробы	20 мкл
Детектирование	длина волны 264±4 нм с записью спектра в диапазоне 200-400 нм
Время хроматографирования одной пробы	7 минут
Время удерживания мелоксикама	около 5,5 минут

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, 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 [11].

В качестве способа пробоподготовки для плазмы был выбран метод осаждения белков 50% раствором трифторуксусной кислоты. Преимущество данного метода заключается в его меньшей трудоёмкости, что является актуальным для проведения анализа большого количества образцов при проведении фармакокинетических исследований, в том числе исследований биоэквивалентности воспроизведённых лекарственных средств. Выбор 50% раствора трифторуксусной кислоты обусловлен тем, что данный осадитель используется в меньших количествах, чем ацетонитрил и метанол, в связи с чем не возникает сильного разбавления пробы. Кроме того, использование ТФУ возможно, поскольку иматиниб не разлагается в кислой среде. Для проведения пробоподготовки к 500 мкл плазмы крови прибавляли 250 мкл 50% раствора трифторуксусной кислоты, встряхивали на вортекс-шейкере, далее центрифугировали в течение 10 мин при 15200 об/мин, после чего 600 мкл надосадочной жидкости переносили в микровиалы для хроматографа.

Реактивы

Иматиниба мезилат, субстанция-порошок (годен до 07.2014); ацетонитрил (gradient grade, Scharlau, Испания); трифторуксусная кислота (extra pure, Scharlau, Испания); натрия дигидрофосфат дигидрат (extra pure, Scharlau, Испания); кислота ортофосфорная (extra pure, Scharlau, Испания).

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.

Исходный раствор иматиниба готовили путём растворения навески стандарта в подготовленной воде и хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8 оС. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора водой.

Программное обеспечение

ChemStation (ver. A.01.04.122) (Agilent Technologies, США).

Результаты и их обсуждение

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили согласно стандартной операционной процедуре лаборатории, подготовленной на основе Руководства по экспертизе лекарственных средств. Под. ред. проф. А.Н. Миронова. Том I, а также Руководств FDA (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) и EMA (Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009) по следующим характеристикам [12-14]: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного обнаружения.

Селективность

Проводили анализ 6 образцов чистой плазмы, образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба в диапазоне концентраций 50-2000 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания иматиниба. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 2 и 3.

Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки число теоретических тарелок составила 8912 теоретических тарелок; фактор асимметрии для пика иматиниба – 0,85.

Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартных растворов иматиниба до получения концентраций: 50 нг/мл; 100 нг/мл; 200 нг/мл; 400 нг/мл; 500 нг/мл; 1000 нг/мл и 2000 нг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ($r^2 = 0,99799$), приведенный на рис. 4.

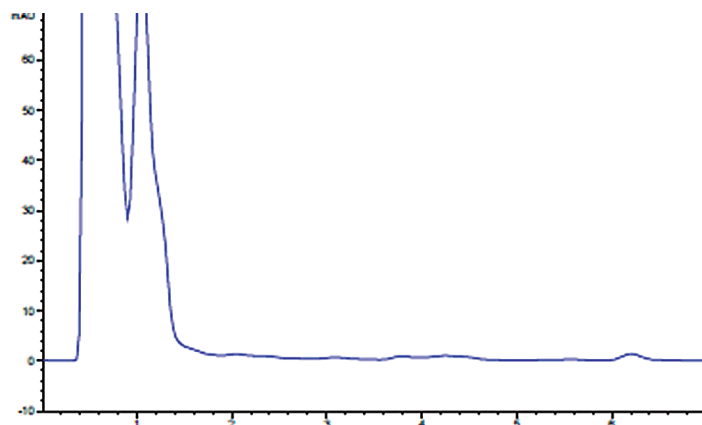


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы.

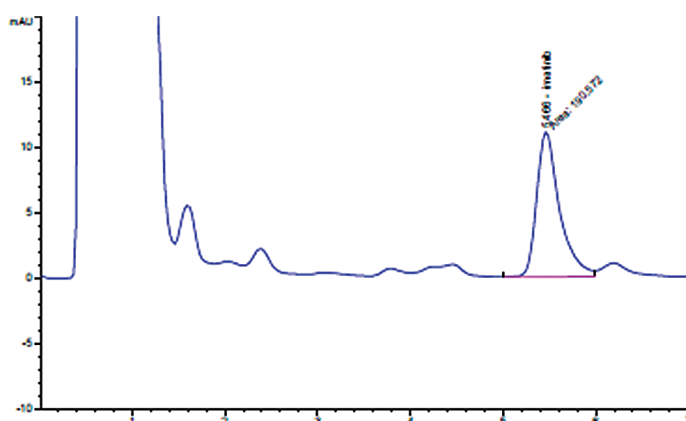


Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба (1000 нг/мл).

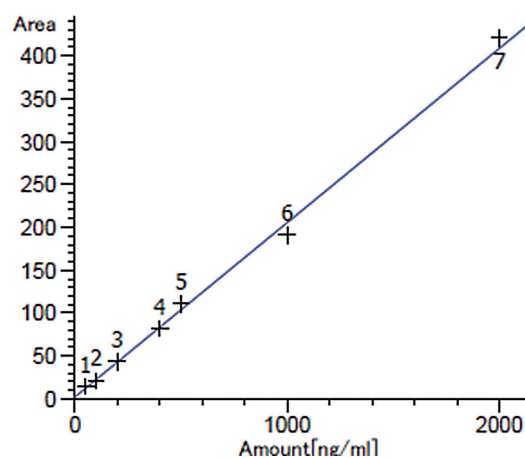


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в плазме.

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).

$C_{\text{факт}}$, нг/мл	50	100	200	400	500	1000	2000
$C_{\text{рассчит}}$, нг/мл	44,81	108,06	206,46	386,77	496,82	906,79	2052,15
ϵ , %	10,2	8,04	3,29	3,32	0,64	9,32	2,62
Норма	Не более 20 %		Не более 15%				

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентраций: 50 нг/мл, 200 нг/мл, 500 нг/мл, 2000 нг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. 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 (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение	S.D.	RSD, %	ϵ , %
50,00	59,09	58,382	2,13	4,37	16,24
	61,22				
	56,98				
	59,33				
	54,98				
200,00	201,97	203,970	1,27	0,85	1,97
	203,09				
	204,22				
	203,91				
	206,20				
500,00	535,33	542,400	7,38	1,33	8,49
	538,21				
	539,87				
	553,39				
	545,40				
2000,00	2058,23	2095,026	23,05	1,31	4,23
	2085,93				
	2105,31				
	2113,80				
	2111,16				

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

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение	S.D.	RSD, %	ε, %
50,00	44,86	53,23	6,00	11,32	6,40
	45,61				
	49,99				
	51,12				
	47,94				
200,00	206,14	206,28	4,12	2,04	3,35
	210,16				
	204,81				
	211,14				
	215,05				
500,00	496,83	516,37	27,93	5,41	3,22
	490,22				
	486,42				
	488,07				
	489,47				
2000,00	2052,85	2097,23	23,84	1,13	4,87
	2104,25				
	2114,22				
	2115,94				
	2114,21				

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 иматиниба в плазме, для которой возможно определение препарата

со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 50 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунках 5.

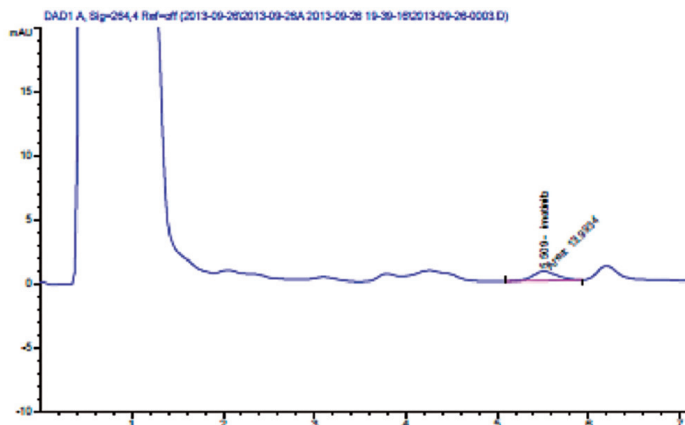


Рисунок 5. Хроматограмма плазмы с содержанием иматиниба на уровне ПКО.

Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартного раствора иматиниба (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре -80 оС), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 10 оС), на уровнях концентраций 50 нг/мл и 500 нг/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 50 нг/мл и 500 нг/мл помещены в морозильник при температуре – 80 оС на 1 мес. Площадь пиков при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Все исследования стабильности проводились в трех аликвотах.

Заключение

Была разработана методика количественного определения противоопухолевого препарата иматиниба методом СВЭЖХ с фотодиодноматричным детектором, обладающая достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения концентраций препаратов в плазме крови с целью исследования фармакокинетики препаратов иматиниба, 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 селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения, стабильность.

Список литературы

1. URL: <http://www.who.int/gho/en/>
2. C. Fausel /Am J Health Syst Pharm. 2007. 64. P. 9-15.
3. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) на 2012 год. Утвержден Распоряжением Правительства РФ №2199-р от 7 декабря 2011 г.
4. 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.
5. Приказ «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года». Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. — М., 2009 г.
6. Tan K.L., Ankathil R., Gan S.H. /Journal of Chromatography B. 2011. 879. 3583-3591.
7. Widmer N., Beguin A., Rochat B. /Journal of Chromatography B. 2004. 803. 285-292.
8. Ю.В. Медведев, И. Е. Шохин, А. Ю. Савченко, Т. А. Ярушок /Разработка и регистрация лекарственных средств. 2012. 1 (2). 74-77.
9. Titier K, Picard S, Ducint D. /Ther Drug Monit. 2005. 5. 634-640.
10. Ю.В. Медведев, Г. В. Раменская, И.Е. Шохин, Т.А. Ярушок /Химико-фармацевтический журнал. 2013. 4. 45-51.
11. Государственный реестр средств измерений. URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx
12. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Часть I // Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2013. — 328 с.
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.

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. 2014
Published in USA, April 14, 2014
5991-4225RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies