

## АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

# РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА КВЕТИАПИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Аналитические решения  
Markets and Applications Programs



**Agilent Technologies**

Authorized Partner Laboratory

### Авторы

Т. Н. Комаров\*,  
Ю. В. Медведев, И. Е. Шохин,  
Л. А. Меньшикова,  
Т. А. Ярушок

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

\* - адресат для переписки



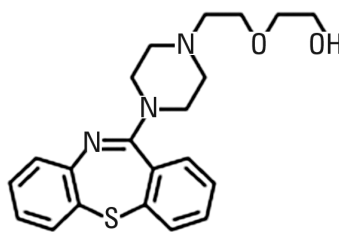
Разработана методика определения препарата кветиапина из группы атипичных нейролептиков, используемого для лечения различных психических заболеваний, в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с целью проведения фармакокинетических исследований препаратов кветиапина. Пробоподготовку проводили путем жидкость-жидкостной экстракции. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения и стабильность проб. Аналитический диапазон методики составил составил 1,99 нг/мл – 249,65 нг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов кветиапина, а также с целью проведения лекарственного мониторинга.

### Введение

Согласно статистике ВОЗ, более половины населения земного шара страдают в той или иной степени от различных заболеваний нервной системы [1]. К ним относятся как нетяжёлые заболевания, такие как сезонные депрессии, различные заболевания, вызываемые влиянием стрессорных факторов на организм человека, органические психотические расстройства, маниакально-депрессивные синдромы различной степени тяжести и др., так и тяжёлые заболевания, требующие длительного, целенаправленного лечения, например, шизофрения. Атипичные антипсихотики широко применяются в фармакотерапии психических расстройств различной степени тяжести. Одним из таких препаратов является кветиапин. Фармакодинамические свойства кветиапина позволяют использовать его в малых дозах (25 мг) для лечения маниакально-депрессивных синдромов, в больших же дозах (200 мг) кветиапин применяют для лечения шизофрении различной степени тяжести [2].



В современном ритме жизни, подвергающем людей постоянному воздействию стрессорных факторов в различных ситуациях, маниакально-депрессивные состояния не являются редкостью. Тяжёлые психические расстройства, такие как шизофрения, исторически являются одними из самых тяжёлых психических заболеваний [1,3,4]. Данная ситуация формирует повышенный интерес к препаратам кветиапина не только у врачей-психиатров и невропатологов, но также и у производителей лекарственных средств. В настоящее время препараты кветиапина включены правительством РФ в «Список жизненно-необходимых и важнейших лекарственных препаратов» 2013 год [5] и широко применяется в медицинской практике. Относительно высокая стоимость оригинального препарата Сероквель<sup>®</sup>, а также импортных аналогов, учитывая переход к импортозамещению, провозглашённый «Стратегией развития фармацевтической промышленности ФАРМА-2020» обуславливает высокий интерес отечественных производителей к разработке воспроизведённых препаратов кветиапина. Также стоит отметить, что препараты кветиапина являются препаратами рецептурного отпуска, препараты высоких доз кветиапина, применяющиеся для лечения шизофрений, применяются, в основном, в условиях стационара.[4] Разработка и производство качественных отечественных препаратов кветиапина в данном случае поможет снизить стоимость курс лечения стационарных больных в несколько раз. В данной ситуации актуальным становится вопрос разработки качественной методики определения кветиапина в плазме крови для проведения исследований биоэквивалентности, а также осуществления лекарственного мониторинга для корректировки доз в условиях стационара.



**Рисунок 1. Структурная формула кветиапина.**

В основе кветиапина лежит сложная гетероциклическая структура дибензотиазепина, основным ядром которой является семичленный цикл с гетероатомами серы и азота. С точки зрения кислотно-основных свойств, кветиапин является основанием, поэтому используется в виде солей – гемифумарата или цитрата. Для количественного определения кветиапина в плазме крови применяются методы ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием после проведения твердофазной экстракции (предел количественного определения – 25 нг/мл) [6], осаждения белков метанолом (предел количественного определения – 50 нг/мл) [7], ВЭЖХ с масс-селективным детектированием (предел количественного обнаружения – 1 нг/мл) [8]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований препаратов кветиапина. В качестве пробоподготовки применяют методы жидкость-жидкостной экстракции, твердофазной экстракции и осаждение белков. При разработке методики нами был выбран метод ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием и в качестве метода пробоподготовки – жидкость-жидкостная экстракция.

## Экспериментальная часть

### Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1260 четырехканальный насос	G1311B
1260 термостат колонок	G1316A
1260 автосамплер	G1329B
1260 диодно-матричный детектор	G1315D

### Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 250*4,6 мм 5 мкм
Предколонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5*4,6 мм 5 мкм
Температура колонки	25°C
Подвижная фаза	50 мМ фосфатный буферный раствор pH 2,5/ацетонитрил в режиме градиентного элюирования (табл.1)
Объем вводимой пробы	100 мкл
Детектирование	УФ-детектор при длине волны 288±4 нм
Время хроматографирования одной пробы	18 минут
Время удерживания	13 мин

Время, мин	Количество компонента, %	
	А	В
0	76	24
11.7	76	24
11.8	40	60
14	40	60
14.1	76	24
16	76	24

Таблица 1. Схема градиентного элюирования.

### Программное обеспечение

ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies

### Растворы и реактивы

Кветиапина гемифумарат, субстанция-порошок (серия №QH 1104007, годен до 03.2014, 99,1% основного вещества), Мегафайн Фарма, Индия, ацетонитрил (gradient grade, Scharlau, Испания); этилацетат (х.ч., Лабтех, Российская Федерация) Натия дигидрофосфат дигидрат (extra pure, Scharlau, Испания); кислота ортофосфорная (extra pure, Scharlau, Испания); натрия гидроксид (extra pure, Scharlau, Испания); вода Milli-Q; вода очищенная.

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

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

### Пробоподготовка

Для пробоподготовки использовали шейкер типа “вортекс” Heidolph Reax Top (Германия); ультрацентрифугу Thermo Scientific SL16 (EC), испаритель под током азота Thermo Scientific Reacti-Therm, орбитальный шейкер Biosan OS-20 (Латвия). Взятие навесок осуществляли с помощью весов весы аналитические OHAUS DV 214C (КНР). 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.

Для пробоподготовки был выбран метод жидкость-жидкостной экстракции в этилацетат. Соответствующая методика была разработана с учётом химических свойств кветиапина, способного, как основание, экстрагироваться в органический экстрагент при смещении pH среды водного раствора (в т.ч. плазмы крови человека) в щелочную сторону. Для этого к 600 мкл плазмы крови (либо к 480 мкл плазмы с прибавлением 120 мкл раствора стандартного образца), помещённым в политетрафторэтиленовые пробирки вместимостью 10 мл, прибавляли 200 мкл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 2,5 мл этилацетата, встряхивали на орбитальном шейкере в течение 8 мин, далее центрифугировали в течение 8 мин при 13000 об/мин, отбирали органический слой, который переносили в вials испарителя и упаривали под током азота при 50 °С до сухого остатка. Далее сухой остаток перерастворяли в 125 мкл подвижной фазы и переносили в вials для хроматографа.

## Результаты и обсуждение

### Валидация методики

Валидацию методики определения кветиапина кислоты в плазме крови человека проводили на основании Руководства по экспертизе лекарственных средств. Под ред. проф. А.Н. Миронова. Том I [4], а также руководства по валидации биоаналитических методик FDA [5] и EMA [6], по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне intra-day и inter-day), предел количественного обнаружения, стабильность проб.

### Селективность

Для определения селективности проводили анализ образца чистой плазмы, образцов чистой плазмы с прибавлением стандартных растворов кветиапина в диапазоне концентраций 1,99 нг/мл – 249,65 нг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания кветиапина. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рисунках 2 и 2а.

### Параметры пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки по пику кветиапина составила 11261 теоретических тарелок, фактор асимметрии составил 0,92.

### Линейность

Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора кветиапина до получения концентраций: ,99 нг/мл; 4,99 нг/мл; 9,98 нг/мл; 19,97 нг/мл; 49,93 нг/мл; 99,86 нг/мл и 249,65 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочный график ( $r^2 = 0,99703$ ), приведенный на Рис. 3, совместно с уравнением калибровочной кривой.

Рисунок 3. Калибровочный график зависимости площади пика кветиапина от его концентрации в плазме.

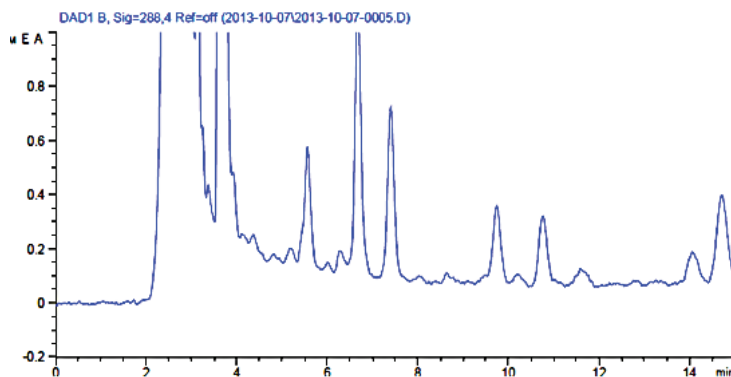
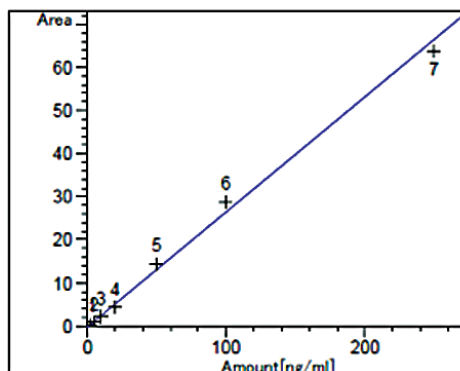


Рисунок 2. Хроматограмма образца чистой плазмы.

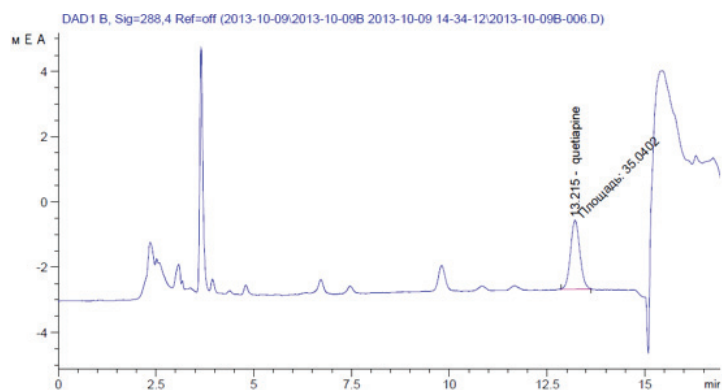


Рисунок 2а. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора кветиапина (100 нг/мл).

```
quetiapine с ожид. ВУ: 12.913
DAD1 B, Sig=288,4 Ref=off
Корреляция: 0.99703
Относит. Стд. Откл.: 1.61690
Формула: y = mx + b
m: 2.67198e-1
b: -1.91178e-1
x: Содержание
y: Площадь
Веса Уровней Калибровки:
Уровень 1 : 1
Уровень 2 : 0.398798
Уровень 3 : 0.199399
Уровень 4 : 0.099649
Уровень 5 : 0.039856
Уровень 6 : 0.019928
Уровень 7 : 0.007971
```

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в Таблице 2.

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	1,99	4,99	9,98	19,97	49,93	99,86	249,65
$C_{\text{рассчит}}$ , нг/мл	2,13	5,09	8,86	17,42	47,19	106,34	249,34
$\epsilon$ , %	7,03	2,00	-11,22	-12,77	-5,49	6,49	-0,12
Норма	Не более 20 %	Не более 15 %					

Таблица 2. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

### Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности проводили анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора кветиапина до получения концентраций: 01,99 нг/мл, 9,98 нг/мл, 49,93 нг/мл, 249,65 нг/мл. Каждый раствор хроматографировали

по 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 ( $\epsilon$ , %), приведенные в Таблицах 3 и 4.

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	$\epsilon$ , %
1,99	2,21	2,278	0,05	2,31	14,47
	2,29				
	2,24				
	2,34				
	2,31				
9,98	9,65	10,528	1,31	12,48	5,49
	10,98				
	11,11				
	12,12				
	8,78				
49,93	45,20	48,028	3,52	7,33	-3,81
	51,79				
	47,25				
	51,61				
	44,29				
249,65	258,37	249,65	258,37	252,034	26,01
	227,18				
	222,32				
	277,36				
	274,94				

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

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
1,99	2,13	2,12	0,19	9,13	6,68
	1,96				
	2,00				
	1,73				
	2,02				
9,98	8,86	10,00	1,14	11,38	0,19
	9,82				
	9,52				
	8,73				
	10,42				
49,93	47,19	47,31	3,10	6,54	-5,24
	51,21				
	44,58				
	45,66				
	44,35				
249,65	249,34	239,66	23,25	9,70	-4,00
	219,62				
	223,98				
	223,95				
	219,52				

Таблица 4. 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 кветиапина в плазме, для которой возможно количественное обнаружение кветиапина со значениями RSD и ε не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 2 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 4.

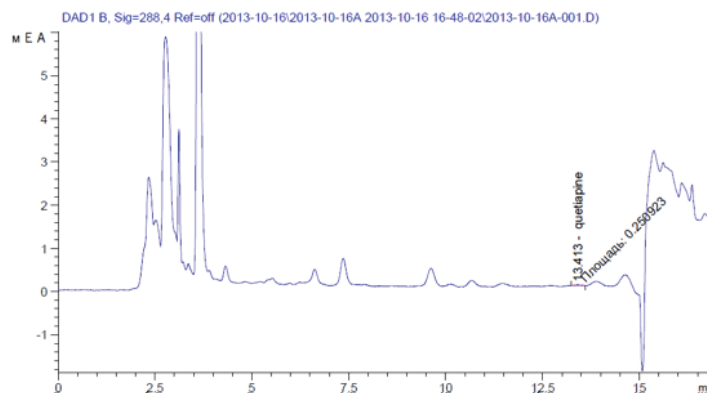


Рисунок 4. Хроматограмма плазмы с содержанием кветиапина на уровне ПКО

## Стабильность

Стабильность образцов была подтверждена для стандартных растворов кветиапина (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 1,99 нг/мл и 249,65 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

## Заключение

Разработана методика количественного определения кветиапина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с применением УФ-детектирования, обладающая достаточной чувствительностью, точностью и селективностью для определения кветиапина в плазме крови с целью исследования фармакокинетики препаратов кветиапина, 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: 28.02.2014)
2. M. Hardoy, A. Garofalo, G. Mellino Quetiapine as add-on treatment for bipolar I disorder: efficacy in preventing relapse of depressive episodes. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health* 3. 17. 2007.
3. URL: (дата обращения: 27.02.2014)
4. Бурчинский С.Г. Биполярные аффективные расстройства: возможности атипичных нейролептиков и критерии выбора // *Нейро News: психоневрология и нейропсихиатрия*. — Ноябрь 2010. — № 6 (25).
5. Распоряжение Правительства РФ от 30 июля 2012 года "Об установлении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2013 год"
6. R. Mandrioli, S. Fanali. HPLC analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30 (2002) 969-977.
7. Helen R. Winter, Willie R. Earley, Jennifer E. Hamer-Maansson. Steady-State Pharmacokinetic, Safety, and Tolerability Profiles of Quetiapine, Norquetiapine, and Other Quetiapine Metabolites in Pediatric and Adult Patients with Psychotic Disorders. *Journal of Child and adolescent psychopharmacology* 1(18) 2008 81-98.
8. Zhiling Zhou, Xin Li, Kunyan Li. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 802 (2004) 257–262.

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, August 15, 2014  
5991-5066RURU

