



УДК 615.074, 543.544.5.068.7, 543.544.3

Определение некоторых противоопухолевых препаратов из списка жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов в плазме крови с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектированием

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

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

Поступила в редакцию 17.10.2014 г.

Разработаны методики определения противоопухолевых препаратов капецитабина, темозоломида, иматиниба в плазме крови человека с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектированием. Разработанные методики валидированы по показателям: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения.

Ключевые слова: темозоломид, капецитабин, иматиниб, СВЭЖХ-МС, плазма, валидация.

Determination of anticancer-drugs in blood plasma with ultra performance liquid chromatography with mass-detection

Komarov T.N., Ramenskaya G.V., Shokhin I.E., Medvedev Yu.V.,
Midruev E.Yu., Lvova A.A., Boldina Yu.E.

Sechenov First Moscow state medical university, 8, Trubetskaya ul., Moscow

The purpose of this study was to develop and validate methods of quantitative determination of anticancer drugs from the list of VED drugs for the 2012-2014 (capecitabine and its active metabolite 5-fluorouracil, temozolomide, imatinib) in human plasma for further application in pharmacokinetic studies.

To conduct the study 3 bioanalytical methods for determining 3 the following drugs in plasma: capecitabine (5-fluorouracil), temozolomide and imatinib were developed and validated. Liquid chromatograph Waters Acquity Systems with a quadrupole mass detector was used for this study. As the stationary phase column was used Acquity UPLC BEH C18, 50*2,1 mm, 1.7 μ m. Sample preparation was performed using protein precipitation. Detection were carried out with the ES+ for the relevant characteristic ions.

The developed methods were validated in accordance with the guidelines by the FDA, EMA and the Russian leadership on the examination of drugs edited by Mironov. All methods satisfies the documents requested for selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification, sample transfe, the stability, the matrix effect. Analytical methods developed for a range of capecitabine (0.1-10 μ g/ml) with 5-fluorouracil metabolite (0.05-5 μ g /ml), temozolomide (0.1-10 μ g/ml) and imatinib (50-2000 ng/mL) in human plasma. Methods validated in terms of: selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification. The methods developed can be applied to the analysis of pharmacokinetics and bioavailability of drugs.

Keywords: temozolomide, capecitabine, imatinib, UPLC-MS, plasma, validation.

Введение

Опухоли – патологические заболевания, возникающие вследствие нарушения механизмов контроля деления, роста и дифференциации клеток организма. Противоопухолевыми препаратами называют лекарственные средства, используемые для лечения доброкачественных и злокачественных новообразований (опухолей). В настоящее время онкологические заболевания при правильной своевременной диагностике, а также грамотно подобранной схеме лекарственной терапии поддаются излечению с хорошим результатом [1]. Противоопухолевые химиотерапевтические препараты занимают значительное место на рынке. Вместе с тем, значительная часть современных противоопухолевых препаратов на российском рынке – это оригинальные препараты, разработанные за рубежом, срок действия патентной защиты на которые истёк недавно или истекает в ближайшее время, что говорит о повышенном интересе к данным препаратам у отечественных и зарубежных производителей, и, как следствие, появлению новых воспроизведённых лекарственных средств на рынке, что делает необходимым разработку правильного подхода к проведению биоаналитических исследований данных препаратов с целью проведения клинических исследований в рамках процедуры оценки качества и регистрации лекарственных средств данной группы.

Разработка и валидация биоаналитических методик для количественного определения противоопухолевых препаратов, относящихся к различным фармакологическим и химическим группам, в биологических жидкостях позволит разработать грамотные современные подходы к проведению клинических исследований как уже существующих препаратов данной фармакотерапевтической группы (в рамках проведения исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств, в том числе на фоне проведения химиотерапии злокачественных новообразований данными препаратами, а также терапевтического мониторинга у онкологических больных), так и инновационных препаратов, схожих с изучаемыми по химической структуре.

Для проведения исследования были выбраны противоопухолевые препараты капецитабин (группа антиметаболитов, аналог пиримидина, пролекарство, активный метаболит – 5-фторурацил), темозоломид (группа алкилирующих препаратов), иматиниб (ингибитор тирозиновой протеинкиназы), анастрозол (группа ингибиторов ароматазы). Изучать фармакокинетику капецитабина рекомендуется совместно с активным метаболитом 5-фторурацилом. Данные препараты являются оригинальными зарубежными разработками, показавшими высокую эффективность в лечении различных видов онкологических заболеваний, распространённых в Российской Федерации, относятся к различным химическим и фармакологическим группам. Препараты включены в списки ЖНВЛП за 2012-2014 гг., перечень стратегически значимых препаратов, а также препаратами, в отношении которых действует стратегия по импортозамещению [2-4]. Все вышесказанное определяет актуальность настоящего исследования, проведённого в рамках выполнения диссертационной работы Комарова Т.Н. и одного из научных направлений кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Эксперимент

Оборудование. Жидкостной хроматограф Waters Acquity с масс-селективным детектором, весы аналитические A&D GR-200, ультрацентрифуга Thermo Scientific SL16, рН/мВ-метр рН 330i, дозаторы переменного объёма Ленпипет Лайт 10-100

мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, шейкер типа "вортекс" Heidolph Reax Top. Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке.

Растворы и реактивы. Темозоломид, 5-фторурацил, капецитабин, иматиниба мезилат, анастрозол (стандартные образцы); образцы чистой плазмы крови и плазмы крови после приёма исследуемых препаратов. Реактивы: метанол для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ, трифторуксусная кислота (х.ч.), хлороводородная кислота (х.ч.), кислота муравьиная (х.ч.), формиат аммония (х.ч.), вода Milli-Q.

В качестве методик пробоподготовки для образцов плазмы для исследуемых препаратов использовались методы жидкость-жидкостной экстракции и осаждения белков раствором трифторуксусной кислоты или ацетонитрилом. Валидация разработанных методик проводилась в соответствии с нормами, установленными на основании действующих российских и зарубежных НД (руководства FDA и ЕМА и руководство по экспертизе ЛС под ред. проф. А.Н. Миронова) [5-7].

Аналитический диапазон (в том числе и пределы количественного определения на уровне $1/20 C_{max}$ [6]) для разработанных методик количественного определения были подобран с учётом ожидаемого фармакокинетического диапазона концентраций.

Обсуждение результатов

1. Капецитабин и 5-фторурацил

Пробоподготовка и анализ. Для пробоподготовки использовался метод осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом. Для этого к 300 мкл исследуемой плазмы крови (или 240 мкл чистой плазмы крови с прибавлением 60 мкл раствора стандартного образца соответствующей концентрации), помещённым в микроцентрифужные пробирки объёмом 1,5 мл прибавлялось 900 мкл ацетонитрила, после чего пробы центрифугировались 10 минут при 14600 об/мин, после чего отбиралась надосадочная жидкость и помещалась в вials для хроматографа.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Acquity UPLC VEN C18, 50x2.1 мм, 1.7 мкм при температуре 40°C, в качестве подвижной фазы использовались: 0.1% водный раствор муравьиной кислоты/ацетонитрил (градиентное элюирование, скорость потока – 0,5 мл/мин), объём ввода пробы – 5 мкл. Параметры масс-детектирования: режим ионизации: ES+ (электроспрей, позитивная полярность); температура источника: 150 °C; температура газа десольватации: 500 °C; поток газа десольватации: 1000 L/hr; SIM-режим: 360.03 – для капецитабина, 130.90 – для 5-фторурацила; время удерживания: 5-фторурацил – около 0.35 мин; капецитабин – 0.6 мин; время анализа: 15 минут.

Валидация методики. Селективность. На хроматограммах образцов чистой плазмы, введённых в инжектор хроматографа после последовательного ввода образцов, содержащих 5-фторурацил (в диапазоне концентраций 0.05 – 5 мкг/мл) и капецитабин (в диапазоне концентраций 0.1 мкг/мл – 10 мкг/мл) не наблюдалось пиков с временам удерживания, соответствующим времени удерживания 5-фторурацила и капецитабина. Исходя из этого, сделан вывод о селективности применяемой методики.

Линейность. Был проведён анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартных растворов капецитабина и 5-фторурацила до получения концентраций 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2; 5 и 10 мкг/мл – для капецитабина и 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2; 5 – для 5-фторурацила. По полученным значениям был построен калибровочный график (для 5-фторурацила $r^2 = 0.9982$, для капецитабина - $r^2 = 0.9966$) (рис. 3)

По полученным значениям концентраций и уравнению линейной зависимости были рассчитаны отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений. Полученные величины соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных концентраций).

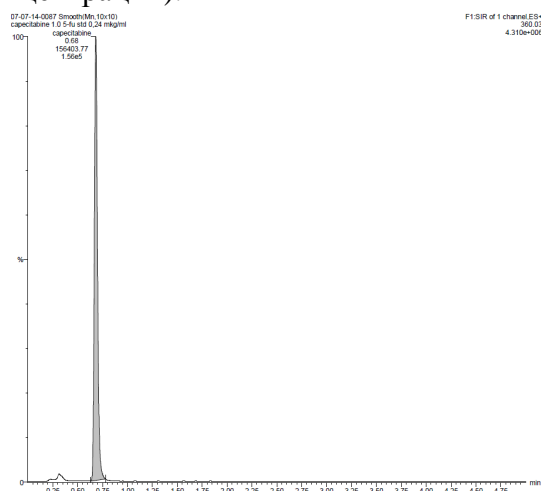


Рис. 1. Хроматограмма образца плазмы крови, содержащего капецитабин

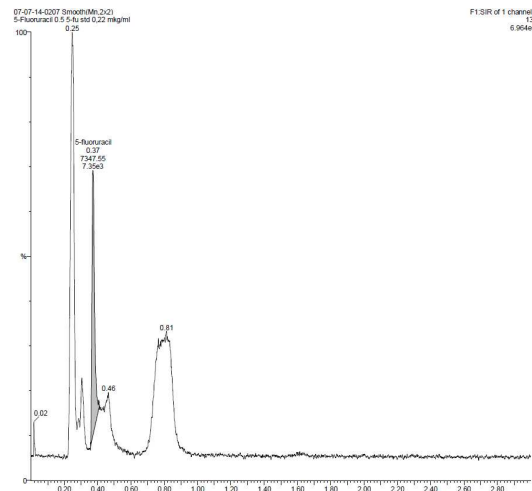
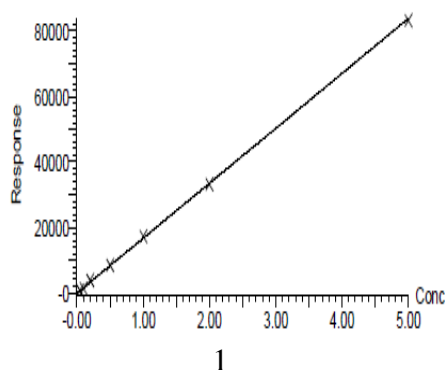
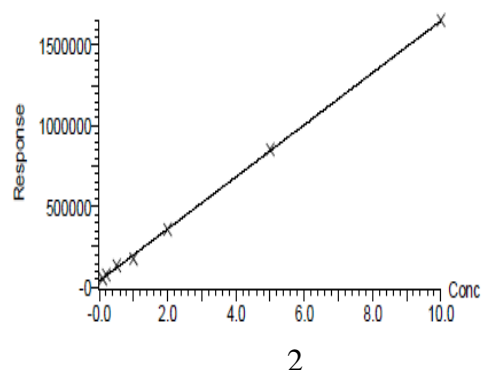


Рис. 2. Хроматограмма образца плазмы крови, содержащего 5-фторурацил



1



2

Рис. 3. Калибровочные графики зависимости площади пиков 5-фторурацила (1) и капецитабина (2) от концентрации в плазме соответственно

Правильность и прецизионность. Для оценки правильности и прецизионности был проведён анализ 4-х образцов чистой плазмы с прибавлением стандартных растворов 5-фторурацила и капецитабина до получения концентраций 0.05, 0.1, 0.5, 5.0 мкг/мл и капецитабина 0.1, 0.2, 1.0, 10.0 мкг/мл соответственно. Каждый образец хроматографировали по 5 раз. Исследование проводили в течение 1-го дня (уровень intra - day) и 2-го дня (уровень inter day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в табл. 1-2. Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) соответствуют нормам (не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15% - для остальных двух концентраций).

2. Темозоломид

Пробоподготовка и анализ. Пробоподготовку образцов плазмы крови, содержащих темозоломид, проводили с помощью осаждения белков раствором ТФУ. Хроматографическое разделение проводили на Acquity UPLC VEN C18, 50x2.1 мм,

1.7 мкм при температуре 40°C, в качестве подвижной фазы использовались: 0.1% водный раствор муравьиной кислоты/ацетонитрил (81:19, скорость потока – 0.5 мл/мин), объём ввода пробы – 10 мкл. Параметры масс-детектирования: режим ионизации: ES+ (электроспрей, позитивная полярность); температура источника: 150°C; температура газа десольватации: 500°C; поток газа десольватации: 1000 L/hr, SIM-режим: 195.03; время удерживания: около 1.6 мин.

Таблица 1. Правильность и прецизионность методики (intra day)

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
5-фторурацил					
0.05	0.048	0.052	0.008	16.09	4.00
	0.052				
	0.047				
	0.04				
	0.052				
0.10	0.09	0.108	0.011	10.14	8.00
	0.11				
	0.11				
	0.12				
	0.11				
0.50	0.48	0.484	0.011	2.36	3.20
	0.49				
	0.48				
	0.50				
	0.47				
5	5.02	5.022	0.068	1.35	0.44
	5.05				
	5.04				
	5.09				
	4.91				
Капецитабин					
0.10	0.1	0.102	0.013	12.78	2.00
	0.09				
	0.11				
	0.09				
	0.12				
0.50	0.51	0.512	0.013	2.55	2.40
	0.52				
	0.52				
	0.49				
	0.52				
1.0	0.99	0.992	0.024	2.41	0.80
	1.01				
	0.98				
	0.96				
	1.02				
10.0	10.09	10.030	0.058	0.58	0.30
	10.07				
	10.05				
	9.99				
	9.95				

Таблица 2. Правильность и прецизионность методики (inter day)

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
5-фторурацил					
0.05	0.048	0.047	0.004	7.62	6.60
	0.052				
	0.047				
	0.04				
	0.052				
0.10	0.09	0.102	0.007	7.23	1.50
	0.11				
	0.11				
	0.12				
	0.11				
0.50	0.48	0.477	0.033	6.92	4.60
	0.49				
	0.48				
	0.50				
	0.47				
5	5.02	4.877	0.150	3.08	2.46
	5.05				
	5.04				
	5.09				
	4.91				
Капецитабин					
0.10	0.1	0.054	0.007	12.95	8.00
	0.09				
	0.11				
	0.09				
	0.12				
0.50	0.51	0.110	0.012	10.50	10.00
	0.52				
	0.52				
	0.49				
	0.52				
1.0	0.99	0.494	0.016	3.19	1.20
	1.01				
	0.98				
	0.96				
	1.02				
10.0	10.09	5.034	0.049	0.98	0.68
	10.07				
	10.05				
	9.99				
	9.95				

Валидация методики. Разработанная методика была валидирована по показателям селективность, линейность (в диапазоне концентраций 0.1–10 мкг/мл, r^2 калибровочной кривой=0.9981), правильность (относительная погрешность составила 2.00; 0.83; 0.36 – для уровня intra day и 6.17; 1.24; 1.20 – для уровня inter day на уровнях концентраций 0.1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл соответственно), прецизионность (относительное стандартное отклонение составило 2.59; 1.66; 1.86 – для уровня intra

day и 5.41; 3.09; 1.82 – для уровня inter day на уровнях концентраций 0.1, 1, 10 мкг/мл соответственно), стабильность, перенос пробы и предел количественного определения (0.1 мкг/мл).

3. Иматиниб

Пробоподготовка и анализ. Пробоподготовку образцов плазмы крови, содержащих иматиниб, проводили с помощью осаждения белков раствором ТФУ. Хроматографическое разделение проводили на Acquity UPLC BEH C18, 50x2.1 мм, 1.7 мкм при температуре 40°C, в качестве подвижной фазы использовались: 0.1% водный раствор муравьиной кислоты/ацетонитрил (58:42, скорость потока – 0.5 мл/мин), объём ввода пробы – 10 мкл. Параметры масс-детектирования: режим ионизации: ES+ (электроспрей, позитивная полярность); температура источника: 150 °C; температура газа десольватации: 500°C; поток газа десольватации: 1000 L/hr; SIM-режим: 494.22; время удерживания: около 0.4 мин.

Валидация методики. Разработанная методика была валидирована по показателям селективность, линейность (в диапазоне концентраций 50–2000 нг/мл, r^2 калибровочной кривой=0,9925), правильность (относительная погрешность составила 11.18; 2.86; 2.56; 3.66– для уровня intra day и 16.78; 4.95; 3.34; 2.90 – для уровня inter day на уровнях концентраций 50, 200, 500 и 5000 нг/мл соответственно), прецизионность (относительное стандартное отклонение составило 17,47; 11,70; 8,38; 8,28 – для уровня intra day и 16,81; 13,29; 10,10; 10,75 – для уровня inter day на уровнях концентраций 50, 200, 500 и 5000 нг/мл соответственно), стабильность, перенос пробы и предел количественного определения (50 нг/мл).

Заключение

Разработаны методики для количественного определения противоопухолевых лекарственных препаратов из списка ЖНВЛП: капецитабина (0,1-10 мкг/мл) совместно с метаболитом 5-фторурацилом (0,05-5 мкг/мл), темозоломида (0,1-10 мкг/мл) и иматиниба (50-2000 нг/мл) в плазме крови человека. Методики валидированы по показателям: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения. Разработанные методики могут быть применены для анализа фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств.

Список литературы

1. Fischer R., David S; Knobf, M Tish. The Cancer Chemotherapy Handbook. 2003. 6th Edition. pp. 47
2. Постановление Правительства РФ от 17.02.2011 №91 «О федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».
3. Распоряжение правительства РФ РФ №2427 от 19.12.2013 г "Об утверждении списка жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2014 г".
4. Приказ «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года».
5. Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. М. 2009 г.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств под ред. проф. А. Н. Миронова. Том I. М.: Гриф и К, 2013.
7. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). U.S.

Government Printing Office: Washington, DC, 2006.

References

1. Fischer R., David S; Knobf, M Tish. The Cancer Chemotherapy Handbook, 2003, 6th Edition, pp.47

2. Postanovlenie Pravitel'stva RF ot 17.02.2011 №91 «O federal'noi tselevoi programme «Razvitie farmatsevticheskoi i meditsinskoi promyshlennosti Rossiiskoi Federatsii na period do 2020 goda i dal'neishuyu perspektivu».

3. Rasporyazhenie pravitel'stva RF RF №2427 ot 19.12.2013 g "Ob utverzhdenii spiska zhiznenno neobkhodimykh i vazhneishikh lekarstvennykh preparatov na 2014 g".

4. Prikaz «Ob utverzhdenii strategii razvitiya farmatsevticheskoi promyshlennosti na period

do 2020 goda». Ministerstvo promyshlennosti i trgovli Rossiiskoi Federatsii, M., 2009 g.

5. Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP), 2010.

6. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv pod red. prof. A. Mironova, Tom I., M., Grif i K, 2013.

7. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2006.

Комаров Тимофей Николаевич - аспирант, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва, тел. +79153505627

Раменская Галина Владиславовна – д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Шохин Игорь Евгеньевич – к.фарм.н., ст. преподаватель, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Медведев Юрий Владимирович - кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Мидруев Егор Юрьевич - аспирант, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Болдина Юлия Евгеньевна - интерн, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Львова Анна Александровна, интерн, кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Komarov Timofey N. - post-graduate student, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow, t.n.komarov@yandex.ru

Ramenskaya Galina V. - PhD, professor, head of chair, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow

Shokhin Igor E. - PhD, lecturer, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow

Medvedev Yuriy V. - PhD, lecturer, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow

Midruev Egor Yu. - post-graduate student, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow

Boldina Yulia E. - intern, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow

Lvova Anna A. - intern, Chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical university, Moscow