



УДК 615.14

Определение иматиниба в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором

Шохин И.Е.^{1,2}, Раменская Г.В.¹, Медведев Ю.В.^{1,2},
Ярушок Т.А.^{1,2}, Шамаль Л.Л.¹

¹ГБОУ ВПО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И. М. Сеченова
Минздрава России, Москва

²ООО «Технология лекарств», Химки

Поступила в редакцию 1.08.2012 г.

Аннотация

Статья посвящена разработке и валидации методики определения иматиниба в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. Осаждение белков проводили ацетонитрилом. Хроматографирование проводили на колонке C18 (2), 100А, 250 x 4,6 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали метанол – фосфатный буфер раствор pH 2,50 (54:46), скорость потока 1,0 мл/мин. Градуировочная кривая имела линейную зависимость в диапазоне от 0,40 мкг/мл до 8,05 мкг/мл иматиниба в плазме крови. Прецизионность методики составила от 3,31 % до 8,78% на уровне within-run и от 4,70 % до 8,25 % на уровне between-run. Правильность методики составила от – 10,07 % до 15,84 на уровне within-run и от 5,63 % до 11,19 % на уровне between-run. Предел количественного определения составил 0,40 мкг/мл. Методика была применена для сравнительного фармакокинетического исследования препаратов иматиниба в плазме крови пациентов.

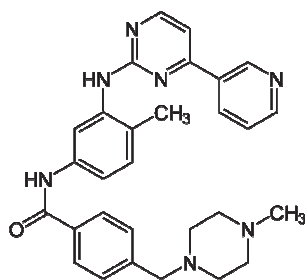
Ключевые слова: иматиниб, плазма, ВЭЖХ.

The paper of Shohin I.E., Ramenskaya G.V., Medvedev Yu.V., Yarushok T.A. and Shamal L.L. is devoted to development and validation of HPLC method determination of imatinib in human plasma with diode-array detection. Sample preparation was made by proteins precipitations using acetonitrile. HPLC analysis was performed on C18 (2) column (100 A, 5 μ m, 4,6 x 250 mm). Methanol –phosphate buffer pH 2.50 (54:46) at 1.0 mL/min was used as mobile phase. The standard curve was linear over the range 0.40 μ g/ml to 8.05 μ g/ml of imatinib in plasma. Within-run precision was 3.31 % to 8.78 % and between-run precision was 4.70 % to 8.25 % determined on spiked samples. The accuracy of the method was – 10,07 % to 15,84 % (within-run) and 5,63 % to 11.19 (between-run). The lower limit of quantification was 0.40 μ g/ml. The method was applied to comparative pharmacokinetics study of imatinib drug products in patients.

Keywords: imatinib, plasma, HPLC

Введение

Иматиниб относится к противоопухолевым препаратам, относящимся к классу таргетных цитостатиков, ингибиторов протеинкиназы. В лекарственных формах представлен в виде соли – мезилата [1]. Структурная формула приведена на ниже



Структурная формула иматиниба

Иматиниб всасывается быстро и эффективно (биодоступность около 98 %), его максимальная концентрация в крови достигает в течение двух часов с момента приема перорально. Период полувыведения иматиниба составляет 18 часов [1].

Иматиниб входит в перечень ЖНВЛП 2012 г [2], а также в перечень из 57 стратегически значимых ЛС, производство которых необходимо наладить на территории РФ до 2015 г [3]. С учетом того, что одной из важнейших задач Стратегии развития фармацевтической промышленности до 2020 г. является импортозамещение лекарственных средств [4], актуальной задачей на сегодняшний день является разработка и производство стратегических ЛС, в том числе иматиниба. Для государственной регистрации в Российской Федерации воспроизведенных ЛП согласно Российскому законодательству необходимо подтверждение их эффективности и безопасности оригинальному препарату, которое устанавливается путем исследований терапевтической эквивалентности либо биоэквивалентности. [5]. Ввиду того, что иматиниб является противоопухолевым препаратом, фармакокинетические исследования на здоровых добровольцах затруднены и обычно проводятся на пациентах, принимающих иматиниб [6].

Опубликован ряд статей с описанием определения иматиниба в различных биологических объектах методом ВЭЖХ с УФ-детектированием [7-12]. Основными преимуществами этого метода являются простота, достаточная чувствительность и доступность, что позволяет применять его в большинстве фармакокинетических лабораторий. В публикациях [13, 14] также приведено определение иматиниба в плазме высокочувствительным (ПКО 10 нг/мл) методом LC-MS/MS, однако ввиду крайне высокой стоимости tandemного масс-спектрометра его применение может быть затруднительно. В связи с этим для разработки и валидации методики определения иматиниба в плазме крови онкологических пациентов нами был выбран метод ВЭЖХ-УФ с применением диодно-матричного детектора.

Эксперимент

Растворы и реактивы

Иматиниб (ООО «Технология лекарств», Россия, содержание иматиниба мезилата 98,97%), метанол (для ВЭЖХ), ацетонитрил (для ВЭЖХ), калия дигидрофосфат (х.ч.), фосфорная кислота (х.ч.), вода деионизированная (Milli-Q Advantage A10, Millipore, Франция).

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы (Pozis, MM-180/20/35, Россия) при температуре от -35°C до -40°C . Стандартные растворы хранили в холодильнике (Indesit, SD 125, Италия) при температуре от 2°C до 8°C .

Для приготовления исходного стандартного раствора 60,7 мг иматиниба мезилата вносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды, перемешивали до полного растворения, доводили объем раствора до метки. Полученный раствор имел концентрацию иматиниба 201 мкг/мл. Стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора водой.

Пробоподготовка.

300 мкл чистой плазмы крови (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором иматиниба) вносили в центрифужные пробирки вместимостью 1,7 мл, прибавляли 1 мл ацетонитрила с помощью дозатора переменного объема (Ленпипет Дигитал 100 – 1000 мкл, Россия), встряхивали на вортекс-шейкере (Heidolph, Reax top, Германия) при 2400 об/мин в течение 20 секунд, центрифугировали на центрифуге (Thermo Scientific, SL16, США) при 15200 об/мин в течение 10 мин. Отбирали 1 мл надосадочной жидкости в виалу для испарителя под током азота (Thermo, Reacti-Therm, США). К остатку в центрифужной пробирке прибавляли 1 мл ацетонитрила, встряхивали на вортекс-шейкере при 2400 об/мин в течение 20 секунд, центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 мин. Отбирали 1 мл надосадочной жидкости в ту же виалу для испарителя под током азота. К остатку в центрифужной пробирке прибавляли 1 мл ацетонитрила, встряхивали на вортекс-шейкере при 2400 об/мин в течение 20 секунд, центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 мин. Отбирали 1,2 мл надосадочной жидкости в ту же виалу для испарителя под током азота. Объединенную пробу испаряли под током азота при 50 °С до сухого остатка. Полученный сухой остаток растворяли в 200 мкл ацетонитрила и переносили в микровиалы для ВЭЖХ.

Условия хроматографирования

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Waters, Alliance e2695 ХС, Сингапур) с диодно-матричным детектором. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол – фосфатный буфер рН 2,50 54:46 (10,2 г калия дигидрофосфата растворяли в 3000 мл воды, перемешивали, доводили рН до 2,50 фосфорной кислотой). Фазу предварительно профильтровали и дегазировали на устройстве для фильтрования под вакуумом (Waters, Solvent Clarification Kit). Скорость потока подвижной фазы: составляла 1 мл/мин. Разделение проводилось с использованием хроматографической колонки Phenomenex Luna 5u C18 (2), 100А, 250 x 4.6 мм, 5 мкм при температуре 30 °С. Объем вводимой пробы: 50 мкл. Время хроматографирования: 15 мин. Детектирование: диодно-матричный детектор: 263 ± 1,2 нм, запись спектра в диапазоне 200-400 нм. Время удерживания иматиниба составило 10 мин.

Обсуждение результатов

Валидация методики

Валидацию методики определения лекарственного вещества в биологической жидкости проводили на основании руководств по валидации биоаналитических методик 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 ЕМА (Guideline on validation of bioanalytical methods (draft).European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009) по следующим

характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне within-run и between-run), предел количественного определения [15, 16].

Специфичность

Проводили анализ 6 образцов чистой плазмы, образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентрации 2,01 мкг/мл по вышеописанной методике. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующем времени удерживания иматиниба.

Хроматограммы чистой плазмы и чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентрации 2,01 мкг/мл приведены на рис. 1-2.

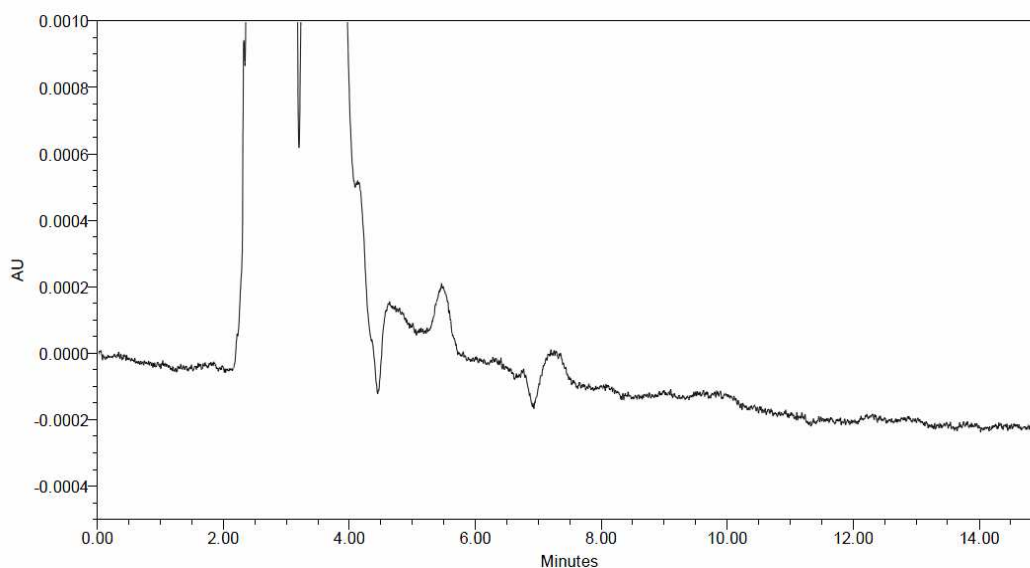


Рис. 1. Хроматограмма чистой плазмы пациентов

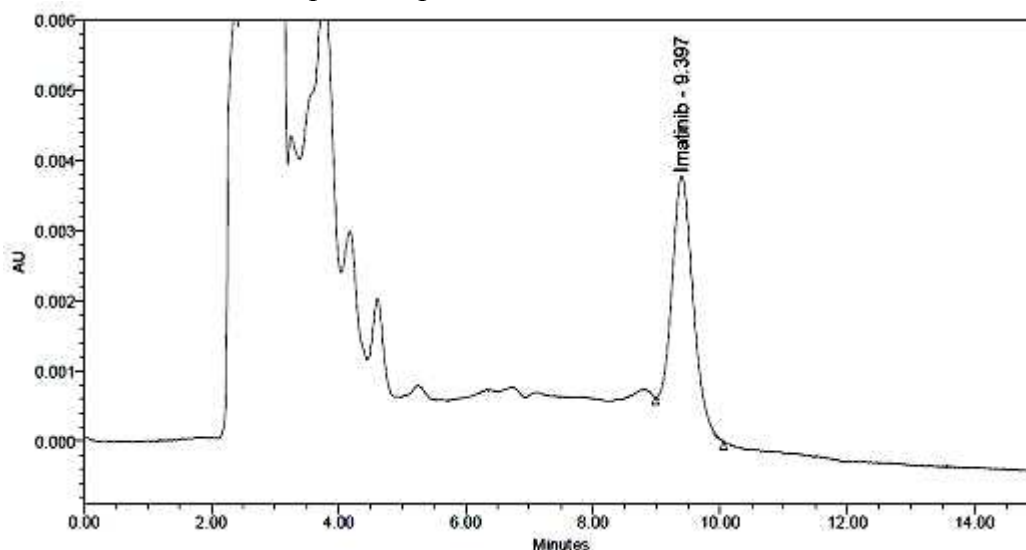


Рис. 2. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентрации 2,01 мкг/мл

Параметры пригодности хроматографической системы:

Эффективность хроматографической колонки по пику иматиниба: 4124 т.т.

Фактор асимметрии пика иматиниба: 1,28

Линейность градуировочного графика

Проводили анализ 5 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентраций: 0,40 мкг/мл, 1,01 мкг/мл, 2,01 мкг/мл, 4,02 мкг/мл, 8,05 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ($r^2 > 0,997$), приведенный на рис. 3.

Отклонения концентраций градуировочных растворов, рассчитанных по градуировочному графику, от фактических значений, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Отклонения концентраций градуировочных растворов от фактических значений

| | | | | | |
|-------------------------------|---------------|--------------|------|-------|------|
| $C_{\text{факт}}$, МКГ/МЛ | 0.40 | 1.01 | 2.01 | 4.02 | 8.05 |
| $C_{\text{рассчит}}$, МКГ/МЛ | 0.48 | 0.89 | 2.20 | 3.79 | 8.12 |
| ϵ , % | 19.52 | -11.49 | 9.38 | -5.71 | 0.97 |
| Норма | Не более 20 % | Не более 15% | | | |

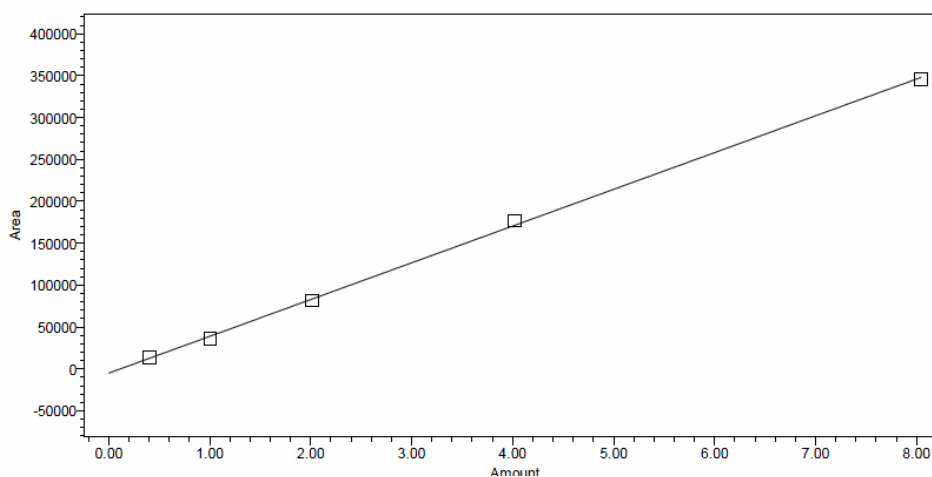


Рис. 3. Градуировочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в плазме

Полученные отклонения соответствуют нормам (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек) [15, 16].

Прецизионность и правильность

Прецизионность и правильность методики определяли на двух уровнях: в течение одного рабочего дня (within-run) и в течение нескольких рабочих дней (between-run). Проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентраций: 0,40 мкг/мл, 2,01 мкг/мл, 8,05 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 3 раза. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в таблицах 3-4.

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) [15, 16].

Таблица 3. Прецизионность и правильность методики (within-run)

| введено (мкг/мл) | найдено (мкг/мл) | найдено (мкг/мл), среднее значение (n=3) | RSD, % (n=3) | ε, % |
|------------------|------------------|--|-----------------|-------|
| 0.40 | 0.49 | 0.47 | 5.67 | 15.84 |
| | 0.44 | | | |
| | 0.47 | | | |
| 2.01 | 2.19 | 2.21 | 3.31 | 10.07 |
| | 2.16 | | | |
| | 2.30 | | | |
| 8.05 | 9.02 | 8.95 | 8.78 | 11.22 |
| | 8,13 | | | |
| | 9,70 | | | |

Таблица 4. Прецизионность и правильность (intra-day)

| введено (мкг/мл) | найдено (мкг/мл) | найдено (мкг/мл), среднее значение (n=3) | RSD, % (n=3) | ε, % |
|------------------|------------------|--|-----------------|-------|
| 0.40 | 0.44 | 0.45 | 6.19 | 11.19 |
| | 0.43 | | | |
| | 0.42 | | | |
| 2.01 | 2.21 | 2.17 | 4.70 | 8.07 |
| | 1.99 | | | |
| | 2.20 | | | |
| 8.05 | 8.04 | 8.50 | 8.25 | 5.63 |
| | 8,00 | | | |
| | 8,11 | | | |

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 иматиниба со значениями RSD и ε не более 20 % в диапазоне линейной зависимости [15, 16].

Предел количественного определения методики составил 0,40 мкг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая предел количественного определения методики, приведена на рис. 4.

Применение к фармакокинетическим исследованиям

Разработанная методика была успешно применена для сравнительного фармакокинетического исследования препаратов иматиниба на онкобольных. Пациенты получали иматиниб (капсулы, 100 мг) перорально. Отбор проб крови осуществляли из вены. Перед приемом препарата отбирали исходную пробу крови (0 образец). Далее отбор крови производился через 0,5 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч после приема препарата. Кровь в количестве 5 мл отбирали в гепаринизированные центрифужные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, отделяли плазму и хранили при температуре - 35 °С до проведения

анализа. Промежуток времени между отбором крови и ее обработкой не превышал 5 мин.¹ Типичная хроматограмма плазмы крови пациентов после перорального применения исследуемого препарата иматиниба приведена на рис 5.

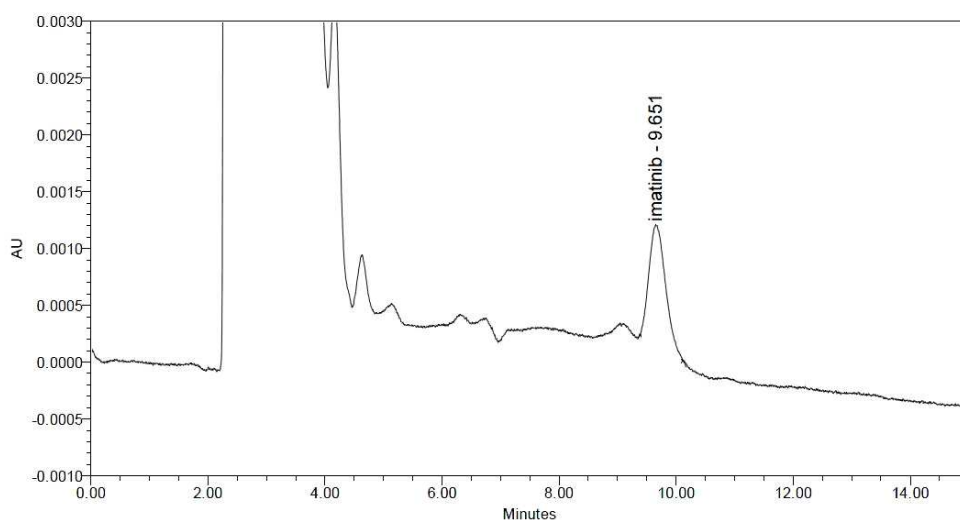


Рис. 4. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора иматиниба до получения концентрации 0,40 мкг/мл

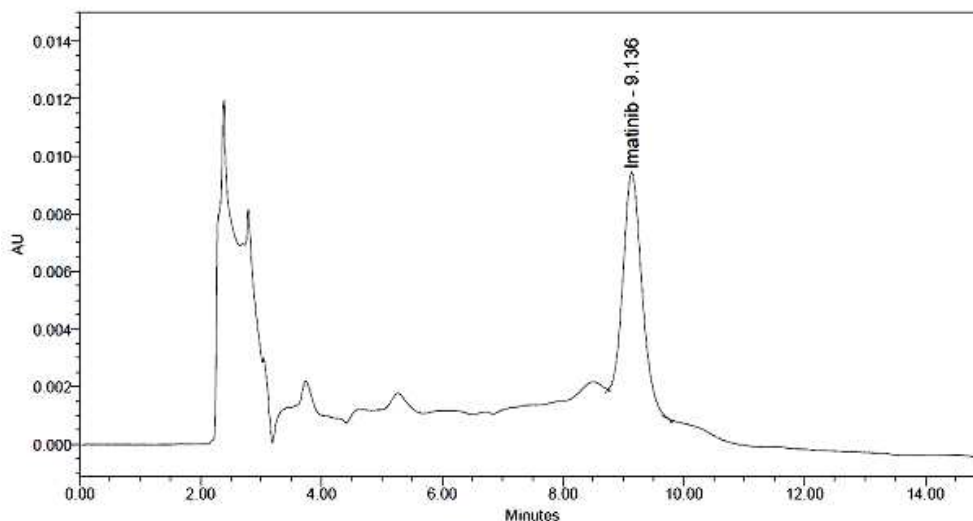


Рис. 5. Типичная хроматограмма плазмы крови пациента спустя 3 ч после перорального применения исследуемого препарата иматиниба

Заключение

Разработанная методика определения иматиниба в плазме крови пациентов оказалась чувствительной, точной и воспроизводимой. Данная методика может быть использована для количественного определения иматиниба в плазме крови

¹ более детальная информация об исследовании не может быть приведена в связи с конфиденциальностью данных

пациентов при фармакокинетических исследованиях новых воспроизведенных лекарственных средств иматиниба.

Список литературы

- 1.База данных <http://www.drugs.com/search.php?searchterm=imatinib>. Иматиниб. Официальная информация FDA (проверено 16.06.2012).
- 2.Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств (ЖНВЛП). Утвержден Распоряжением Правительства РФ N 2199-р от 7 декабря 2011 г.
- 3.Список стратегически значимых лекарственных средств. <http://жнвлс.рф/2011/01/strategicheski-vazhnye-lekarstva/> (проверено 16.06.2012).
- 4.Приказ «Об утверждении стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 г». Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. – М., 2009 г. http://www.minpromtorg.gov.ru/ministry/strategic/sectoral/7/utverzhdennaya_strategiya_farma2020_231009.pdf (проверено 16.06.2012).
- 5.Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
- 6.FDA bioequivalence Guidance on Imatinib Mesylate. Finalized Oct. 2011. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm118261.pdf>. (проверено 16.06.2012).
- 7.Teoh M., Narayanan P., Moo K.S., Radhakrisman S., Pillappan R., Bukhari N. and Segarra I. HPLC determination of imatinib in plasma and tissues after multiple oral dose administration to mice// Pak. J. Pharm., Sci. 2003. Vol. 23. No. 1. P. 35-41.
- 8.Schleyer E, Pursche S., Kohne C.H. Liquid chromatographic method of detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cellpreparations// J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004. Vol. 799. P. 23-36.
- 9.Velpandian T., Mathur R., Agarwal N.K., Arora B., Kumar L., Gupta S.K. Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinib in biological samples// J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004. Vol. 804. P. 431-434.
10. Widmer N., Beguin A., Rochat B. Determination of imatinib (Gleevec) in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection// J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004. Vol. 803. P. 285-292.
11. Oostendorp R.L., Beijnen J.H., Schellens J.H., van Tellingen O. Determination of imatinib mesylate and its main metabolite (CGP74588) in human plasma and urine specimens by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography// Biomed Chromatogr. 2007. Vol. 21. P. 747-754.
12. le Coutre P., Kreuzer K.A., Pursche S. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588// Cancer Chemother Pharmacol. 2004. Vol. 53. P. 313-323.
13. Titier K., Picard S., Ducint D. Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry// Ther Drug Monit. 2005. Vol. 27. No. 5. P. 634-640.
14. Awidi A., Salem I.I., Najib N., Mefleh R., Tarawneh B. Determination of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia by high performance liquid

chromatography-ultraviolet detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Methods' comparison// Leuk Res. 2010. Vol. 34. No. 6. P. 714-717.

15. 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.

16. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

Шохин Игорь Евгеньевич — к.ф.н., ст. преп. кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии фармацевтического факультета, Москва

Раменская Галина Владиславовна — проф., д.ф.н., директор НИИ Фармации Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, зав. кафедрой фармацевтической химии с курсом токсикологической химии; Москва

Медведев Юрий Владимирович — к.ф.н., ассистент кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии фармацевтического факультета; Москва

Ярушок Татьяна Александровна — аспирант кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии фармацевтического факультета; Москва

Шамаль Лилия Леоновна — аспирант испытательной лаборатории экспертизы качества ЛС НИИ Фармации Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; Москва

Shohin Igor E. — PhD, senior lecturer of chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; Moscow, e-mail: sovdep2007@yandex.ru

Ramenskaya Galina V. — PhD, Director of Institute of Pharmacy, head of chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University; Moscow

Medvedev Yuri V. — PhD, assistant of chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Yarushok Tatiana A. — hD student of chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; Moscow

Shamal Lilia L. — PhD student of drugs products QC laboratory of Institute of Pharmacy I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; Moscow