

УДК

DOI: 10.18413/2313-8955-2015-1-3-104-

Автина Т.В.,
Куликов А.Л.,
Покровский М.В.

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ
МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМАТИНИБА
В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРО-
МЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Автина Татьяна Валерьевна,

кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии
Медицинского института,
НИУ «БелГУ»

ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308005
e-mail: avtina_t@bsu.edu.ru

Куликов Александр Леонидович,

аспирант кафедры фармакологии, Медицинского института,
НИУ «БелГУ»

ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308005
e-mail: kulikov@bsu.edu.ru

Покровский Михаил Владимирович,

доктор медицинских наук, профессор; Медицинского института,
НИУ «БелГУ»

ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308005
e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

Аннотация

Разработан метод количественного определения противоопухолевого средства – ингибитора протеинкиназы в плазме крови с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Аналитический диапазон метода составил от 0,03 до 3,83 мкг/мл в плазме крови. Метод применен для изучения биоэквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата, содержащего в качестве активного фармацевтического ингредиента иматиниб, в сравнении с референтным.

Ключевые слова: иматиниб; плазма крови; высокоэффективная жидкостная хроматография; масс-спектрометрический детектор; валидация.

UDC

DOI: 10.18413/2313-8955-2015-1-3-104-

*Avtina T.V.,
Kulikov A.L.,
Pokrovsky M.V.*

**DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF METHODS OF QUANTITATIVE
DETERMINATION OF IMATINIB
IN THE BLOOD PLASMA BY HIGH
PER-FORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH MASS
SPECTROMETRIC DETECTION**

Avtina Tatyana Valerievna

PhD in Pharmaceutical Sciences, Associate Professor

Department of Pharmacology

Belgorod State National Research University

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

e-mail: avtina_t@bsu.edu.ru

Kulikov Aleksandr Leonidovich

Postgraduate Student, Department of Pharmacology

Belgorod State National Research University

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

e-mail: kulikov@bsu.edu.ru

Pokrovsky Mikhail Vladimirovich

Doctor of Medical Sciences, Professor

Department of Pharmacology

Belgorod State National Research University

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

АБСТРАКТ

The authors have developed a method of quantitative determination of an antitumor agent – a protein kinase inhibitor in the blood plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. The analytical method range was from 0.03 to 3.83 g / ml in plasma. The method was used for the bioequivalence study of the reconstituted medicine containing imatinib as an active pharmaceutical ingredient compared with the reference.

Keywords: imatinib; blood plasma; high performance liquid chromatography; Mass spectrometric detector; validation.

Иматиниба мезилат – ингибитор протеинтирозинкиназы (рис. 1). В основе клинической эффективности иматиниба лежит ингибирование BCR-ABL-киназы. На первых этапах доклинических и клинических исследований была доказана эффективность фармацевтической субстанции, а впоследствии и референтного препарата, для лечения Ph-позитивного хронического миелоидного лейкоза в любой фазе. Впоследствии препарат был одобрен для лечения больных с KIT (CD117)-позитивными неоперабельными и/или метастатическими стромальными опухолями желудочно-кишечного тракта [3, 4]. В настоящее время FDA одобрило новое показание к применению препарата Гливек – для лечения детей с впервые выявленным острым лимфобластным лейкозом с положительной филадельфийской хромосомой (Ph +) [6]. В связи с клинической значимостью рассматриваемого препарата, разработка и вывод на фармацевтический рынок воспроизведенных лекарственных препаратов, содержащих иматиниб, является актуальным.

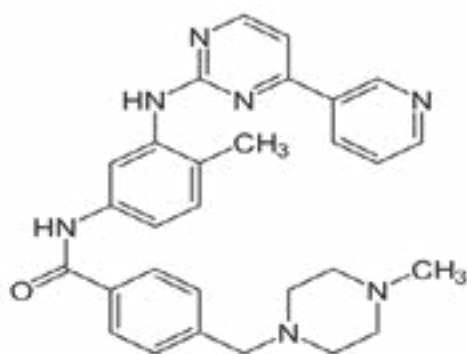


Рис. 1. Иматиниб
Fig. 1. Imatinib

В связи с ФЗ «Об обращении лекарственных средств», одним из разделов регистрационного досье, подаваемого для регистрации воспроизведенного лекарственного препарата, должен быть отчет о проведении исследований его биоэквивалентности [2]. В настоящее время метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) является эталонным для качественной и количественной оценки аналита в плазме при проведении данного исследования.

В связи с изложенным целью работы явилась разработка и валидация методики количественного определения иматиниба методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

Экспериментальная часть.

В работе использовали следующие реактивы: иматиниб, дазатиниб (ф. Sigma), ацетат аммония (ф. Merck), метанол (ф. Merck), ацетонитрил для градиентной хроматографии (ф. Merck), вода очищенная и деионизированная с помощью системы «Gene Pure» (Thermo Scientific, США).

Определение иматиниба в биологической жидкости (плазма крови человека) проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 RS LC (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенным вакуумным дегазатором, градиентным насосом, автосемплером, термостатом колонок. Детекцию аналита проводили на масс-спектрометре Velos Pro (Thermo Scientific, США) с ионизацией в нагреваемом электроспрее (H-ESI-II).

Пробоподготовка.

С применением стандартных образцов дазатиниба и иматиниба (ф. Sigma) были приготовлены их исходные растворы в 20% растворе ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте в концентрациях 0,0016% и 0,04%, соответственно. Путем серийного разведения исходного раствора иматиниба были получены его рабочие растворы для построения калибровочной кривой (в концентрациях от 0,03 мкг/мл до 3,83 мкг/мл в плазме) и образцов контроля качества (0,1 мкг/мл; 1,8 мкг/мл и 3 мкг/мл в плазме).

Для приготовления указанных растворов к 600 мкл плазмы прибавляли по 50 мкл 1% водного раствора муравьиной кислоты, 50 мкл раствора внутреннего стандарта, 50 мкл соответствующего исходного раствора иматиниба и 700 мкл ацетонитрила. Для приготовления бланка к плазме вводили 50 мкл 1% водного раствора муравьиной кислоты и 700 мкл ацетонитрила.

ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке размером 50×2,1 мм, заполненной обращённо-фазовым сорбентом C18 с размером частиц 1,7 мкм (ACQUITY

UPLC ВЕН С18) при температуре 45 °С. Хроматографический анализ проводили с использованием системы UltiMate 3000 RS LC

сопряженной с масс-спектрометрическим детектором в изократическом режиме при следующих хроматографических условиях:

Параметры ВЭЖХ	
Колонка:	ACQUITY UPLC ВЕН размером 50×2,1 мм, заполненная обращённо-фазовым сорбентом С18 с размером частиц 1,7 мкм
Температура колонки (°С):	45
Объем пробы (мкл):	2 мкл
Подвижная фаза:	метанол:0,01М раствор ацетата аммония в воде (1:1)
Скорость потока (мл/мин):	0,4
Ориентировочные времена удерживания (мин):	Иматиниб – 2; Дазатиниб – 3.
Время инъекции (мин):	6

Исследуемые аналиты в плазме детектировали с применением масс-спектрометрического детектора Velos Pro – двухкамерная линейная квадрупольная ионная ловушка низкого и высокого давления с ионизацией

в нагрываемом электроспрее (H-ESI-II) с технологией двойной десольвационной зоной. Сканирование осуществляли по селективно выбранным ионам (SIM). Параметры работы детектора представлены ниже:

Параметры масс-спектрометра:	
Инструмент:	Velos Pro (Thermo Scientific, США)
Тип ионизации:	H-ESI
Полярность:	Иматиниб «+»; Дазатиниб «+».
Переход масс:	Иматиниб 494.3 →394.3; Дазатиниб 488.0→401.2.
Энергия коллизии:	Иматиниб – 29; Дазатиниб – 35.
Напряжение на источнике (V):	Иматиниб – 4500; Дазатиниб – 5500.
Температура источника (°С):	Иматиниб – 300 ; Дазатиниб – 300.
Температура капилляра (°С):	Иматиниб – 350; Дазатиниб – 350.
Sheath gas pressure (Arb):	Иматиниб – 40; Дазатиниб – 40.
Aux gas pressure (Arb):	Иматиниб – 15; Дазатиниб – 15
S-lens RF level (%):	Иматиниб – 63,5; Дазатиниб – 60,6.

Результаты и обсуждение:

Применение в методике колонки ACQUITY UPLC ВЕН размером 50 × 2,1 мм, заполненной обращённо-фазовым сорбентом С18 с размером частиц 1,7 мкм позволило получить удовлетворительную форму пиков иматиниба и дазатиниба. Хроматографическая система считалась пригодной при выполнении следующих критериев: относительное стандартное отклонение отношения площадей определяемых пиков к пику внутреннего стандарта, рассчитанное по шести последовательным хрома-

тограммам раствора одной концентрации – не более 7 %; фактор асимметрии пиков иматиниба и дазатиниба – не более 2,2; эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику иматиниба – не менее 1000 теоретических тарелок; соотношение сигнал/шум для раствора на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) не менее 10:1. Хроматограммы дазатиниба (внутренний стандарт) и иматиниба с концентрацией в плазме на уровне НПКО (0,03 мкг/мл в плазме) представлены на рис. 2.

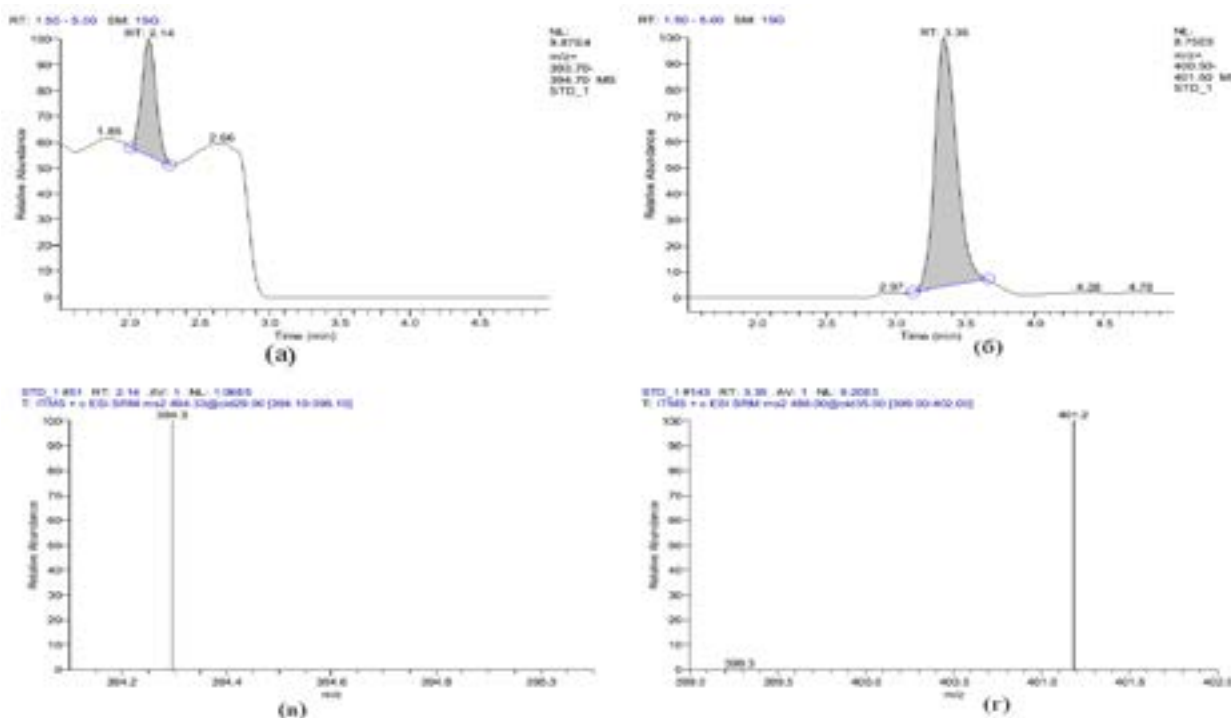


Рисунок 2. Хроматограммы и масс-спектры иматиниба (рис. 2а и 2в) и дазатиниба (рис. 2б и 2г) в плазме

Figure 2. Chromatography and mass spectra of imatinib (Fig. 2a and 2b) and dasatinib (Fig. 2b and 2d) in plasma

Валидацию аналитического метода проводили в соответствии с отечественными и зарубежными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам по следующим показателям: селективность, матричный эффект, линейность, нижний предел количественного определения, линейность, специфичность, прецизионность, воспроизводимость [1, 4].

Для того, чтобы избежать нарушения линейности градуировочной зависимости, связанной с влиянием компонентов биологической матрицы на ионизацию в масс-спектрометрии одним из важных этапов при разработке и валидации методик в плазме крови, является из-

учение матричного эффекта. Указанный показатель исследовали на шести образцах биологической матрицы различных доноров. Значения коэффициента вариации (CV) нормализованных матричных факторов для шести различных матриц на нижнем и верхних уровнях концентраций не превышало 15% и, составили 12,8% и 5,1%, соответственно.

Для построения градуировочной кривой (рис. 3) использовали рабочие растворы на семи уровнях концентраций в трех повторностях, бланк (чистая матрица) и бланк с внутренним стандартом (матрица без введения аналита, но с добавлением внутреннего стандарта).

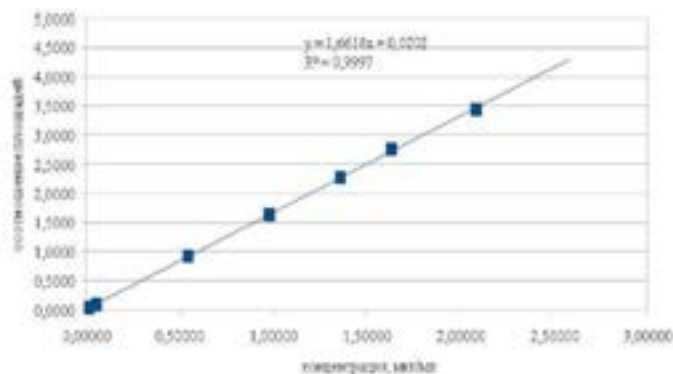


Рисунок 3 – Линейность методики определения иматиниба в диапазоне концентраций от 0,03 до 3,8 мкг/мл

Figure 3. Linearity methods for determining imatinib concentrations ranging from 0.03 to 3.8 mcg / ml

Извлеченные стандарты иматиниба из плазмы позволили получить линейную калибровочную кривую в динамическом диапазоне от 0,03 до 3,83 мкг в 1 мл биологического объекта с коэффициентом R^2 равным 0,9997. Ни одна из ошибок не превышала допустимых пределов – не более 20% для раствора НПКО, и не более 15% - для остальных концентраций.

Правильность методики оценивали на образцах биологической матрицы с добавле-

нием известных количеств аналита на уровнях концентраций: НПКО, нижний контроль качества (НКК), средний контроль качества (СКК) и верхний контроль качества (ВКК), которые получали независимо от растворов, приготовленных для подтверждения линейности методики. Правильность выражали в процентах от номинального значения иматиниба. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Правильность определения иматиниба в плазме

Table 1

The correctness of the definition of imatinib plasma

Уровень концентрации раствора	$C_{\text{введ}},$ МКГ/ МЛ	Цикл 1		Цикл 2		Цикл 3		Цикл 4	
		$C_{\text{найд}},$ МКГ/МЛ	CV, %	$C_{\text{найд}},$ МКГ/ МЛ	CV, %	$C_{\text{найд}},$ МКГ/ МЛ	CV, %	$C_{\text{найд}},$ МКГ/ МЛ	CV, %
НПКО	0,030	0,0277	9,7	0,0304	9,0	0,0270	5,0	0,0332	2,0
		0,0316		0,0311		0,0302		0,0339	
		0,0300		0,0258		0,0292		0,0349	
		0,0333		0,0295		0,0278		0,0333	
		0,0260		0,0331		0,0303		0,0338	
НКК	0,100	0,1054	8,4	0,0968	3,9	0,0885	1,8	0,0934	3,1
		0,0919		0,0895		0,0884		0,0948	
		0,1132		0,0870		0,0885		0,0931	
		0,0946		0,0918		0,0902		0,0998	
		0,1008		0,0916		0,0922		0,0930	
СКК	1,80	1,8385	2,2	1,9570	3,6	1,8740	3,1	1,7862	2,2
		1,7426		1,7764		1,9424		1,7001	
		1,8330		1,8527		1,9452		1,7612	
		1,7980		1,8449		1,9052		1,7258	
		1,7811		1,8252		1,8051		1,7847	
ВКК	3,00	2,9017	2,8	2,9674	4,8	2,7971	3,8	2,8513	2,7
		2,9098		3,0135		2,7798		2,9256	
		2,7624		2,7706		2,6126		2,7188	
		2,7584		2,6888		2,6625		2,8653	
		2,9072		2,9214		2,8663		2,8373	

Для проведения теста прецизионность проводили шесть повторных измерений концентрации (НПКО, НКК, СКК, ВКК) иматиниба в одном и том же образце по вышеописанной методике в четырех разных цикла.

Все результаты были близки между собой (табл. 2).

Таблица 2

Прецизионность методики определения иматиниба в плазме

Table 2

Precision of methods for determining imatinib in plasma

Рас- твор	$C_{\text{найд ср'}}$ мкг/мл	$C_{\text{найд ср'}}$ мкг/мл	$C_{\text{найд ср'}}$ мкг/мл	$C_{\text{найд ср'}}$ мкг/мл	CV,%	Критерий приемлемости
	день 1	день 2	день 3	день 4		
НПКО	0,0297	0,0300	0,0289	0,0338	7,2	не более 20 %
НKK	0,1012	0,0914	0,0896	0,0948	5,4	не более 15 %
СКК	1,7986	1,8513	1,8944	1,7516	3,4	не более 15 %
ВКК	2,8479	2,8723	2,7437	2,8397	2,0	не более 15 %

Таким образом, разработанная методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

проста в исполнении, соответствует требованиям валидационных характеристик и достоверно позволяет определять иматиниб в плазме крови в концентрациях от 0,03 мкг/мл до 3,83 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Миронов А.Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств, Т. I. М.: Гриф и К, 2013. 322 с.
2. Федеральный закон РФ от 12 апреля 201 (ред. от 13.07.2015 г.) №61 ФЗ «Об обращении лекарственных средств» // Российская газета от 14 апреля 2010 г. №5157.
3. Gomes AL, Bardales RH Molecular analysis of c-KIT and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS // Am J Clin Pathol. 2007. Jan; 127(1). P. 89-96.
4. 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).
5. Joensuu H, et al. Twelve vs. 36 months of adjuvant imatinib (IM) as treatment of operable GIST with a high risk of recurrence: Final results of a randomized trial (SSGXVIII/AIO). 47th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. Abstract No. LBA1. June 5, 2011.
6. Pediatric oncology subcommittee of the oncology drugs advisory committee (ODAC) meeting [Электронный ресурс] URL: <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/oncologicdrugsadvisorycommittee/ucm330208.pdf> (дата обращения 03.12.2015).

REFERENCES:

1. Mironov A.N. The Guidelines for Expertise of Medicines, T. I. M.: Grif and K, 2013. 322 p.
2. The Federal Law of April 12, 201 (ed. of 07.13.2015) №61 of the Federal Law "On Circulation of Medicines" // Rossiiskaya Gazeta, April 14, 2010 №5157.
3. Gomes AL, Bardales RH Molecular analysis of c-KIT and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS // Am J Clin Pathol. 2007. Jan; 127 (1). P. 89-96.
4. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Government Printing Office, Washington, DC (2001).
5. Joensuu H, et al. Twelve vs. 36 months of adjuvant imatinib (IM) as treatment of operable GIST with a high risk of recurrence: Final results of a randomized trial (SSGXVIII/AIO). 47th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. Abstract No. LBA1. June 5, 2011.
6. Pediatric oncology subcommittee of the oncology drugs advisory committee (ODAC) meeting [electronic resource] URL: <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/oncologicdrugsadvisorycommittee/ucm330208.pdf> (date of access December 3, 2015).