

УДК 615.322: 582.734.4

В.С. ШНАУКШТА, М.У. ДУЙСЕНОВА, А.М. ЕЛЬЖАСОВА

РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК, Республика Казахстан

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСЕЛЬТАМИВИРА КАРБОКСИЛАТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС

Резюме. Разработана и валидирована методика количественного определения осельтамивира карбоксилат (OSTC) в плазме крови человека. Пробоподготовку проводили осаждением белков метанолом. Количественное определение OSTC проводили методом ВЭЖХ с масс-селективным детектором Triple Quad QQQ LC/MS. В качестве подвижной фазы использовали раствор: муравьиная кислота 0,1%– метанол с градиентным элюированием. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, эффект переноса и стабильность растворов. Путем валидации доказана пригодность разработанной биоаналитической методики для фармакокинетических исследований. Полученный аналитический диапазон 10-1000 нг/мл позволяет применять методику для исследований биоэквивалентности.

Ключевые слова: осельтамивира карбоксилат, плазма крови, ВЭЖХ-МС, валидация.

В.С. Шнаушшта, М.У. Дуйсенова, А.М. Ельжасова

Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығы

ВЭЖХ-МС ӘДІСІМЕН ҚАН ПЛАЗМАСЫНДАҒЫ КАРБОКСИЛАТ ОСЕЛЬТАМИВИРІН САНДЫҚ АНЫҚТАУ ӘДІСТЕМЕСІН ӨЗІРЛЕУ ЖӘНЕ ВАЛИДАЦИЯЛАУ

Түйін Адам қанының плазмасында карбоксилат осельтамивирін (OSTC) сандық анықтау әдістемесі әзірленді және валидацияланды. Пробоподготовку шығарып осаждением белоктар метанолом. OSTC сандық анықтамасы Triple Quad QQQ LC/MS жаппай селективті детекторымен HPLC әдісімен жүргізілді. Ерітінді жылжымалы фаза ретінде пайдаланылды: градиент элюциясы бар 0,1% метанол қышқылы. Өзірленген әдістеме келесі валидациялық параметрлер бойынша валидацияланды: селективтілік, сызықтық, дұрыстық, дәлдік, сандық анықтау шегі, тасымалдау әсері және ерітінділердің тұрақтылығы. Валидация арқылы фармакокинетикалық зерттеулер үшін әзірленген биоаналитикалық Әдістеменің жарамдылығы дәлелденді. Алынған 10-1000 нг/мл аналитикалық диапазон биоэквиваленттілікті зерттеу әдістемесін қолдануға мүмкіндік береді.

Түйінді сөздер: осельтамивира карбоксилаты, қан плазмасы, ВЭЖХ-МС, валидация.

V.S. Shnaulshta, M.U. Duysenova, A.M. Elzhasova

«National Center for Expertise of Medicines and Medical Devices» of the Committee for Medical and Pharmaceutical Control of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF BIOANALYTICAL TECHNIQUE OF OSELTAMIVIR CARBOXYLATE QUANTITATIVE DETERMINATION IN HUMAN PLASMA BY LC-MS

Resume. A method for the quantitative determination of oseltamivir carboxylate (OSTC) in human blood plasma was developed and validated. Sample preparation was carried out by precipitation of proteins with methanol. Quantitative determination was carried out by HPLC with a Triple Quad QQQ LC / MS mass selective detector. The mobile phase was 0.1% formic acid - methanol with gradient elution. The developed method was validated according to the following validation parameters: selectivity, linearity, correctness, precision, limit of quantitative determination, transfer effect, stability of solutions. The suitability of the developed bioanalytical method for pharmacokinetic studies was proved by validation. The obtained analytical range of 10-1000 ng / ml allows the method to be used for bioequivalence studies.

Keywords: oseltamivir carboxylate, blood plasma, HPLC-MS, validation.

ВВЕДЕНИЕ

Осельтамивир является противовирусным препаратом, применяемым при гриппе типов А и В. Препарат является пролекарством, активный метаболит (осельтамивира карбоксилат) которого селективно подавляет нейраминидазу вируса, тормозит рост вируса гриппа и подавляет репликацию вируса и его патогенность in vivo [1]. Структурная формула метаболита осельтамивира приведена на рисунке 1.

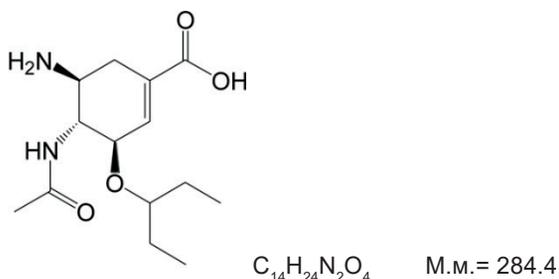


Рисунок 1 - Структурная формула осельтамивира карбоксилат

Для государственной регистрации воспроизведенного лекарственного препарата в Республике Казахстан согласно законодательству необходимо подтверждение его эффективности и безопасности оригинальному препарату, которое устанавливается путем клинического исследования биоэквивалентности [5, 6]. Обязательным этапом на пути проведения такого исследования является разработка аналитической методики количественного

определения лекарственного средства в плазме крови с предварительным подбором условий выделения исследуемого вещества из биологической матрицы [2, 3, 4, 8, 9].

Как известно, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектором LC/MS является основным для количественной оценки аналита в биологической матрице при проведении данного исследования [10]. В связи с этим целью работы явилось разработка и валидация методики количественного определения осельтамивира карбоксилата (OSTC) в плазме крови методом ВЭЖХ-МС.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Количественное определение OSTC в плазме крови проводили на хроматографе Agilent 1290 Infinity II LC с масс-селективным детектором 6420A Triple Quad QQQ LC/MS (Agilent Technologies, USA). Данные обрабатывали при помощи программного обеспечения «Agilent MassHunter Workstation», USA. В процессе подготовки проб использовали вихревую мешалку Heidolph Multi Reax (Германия) в центрифугу Eppendorf 5415D (Германия). Взятие навесок осуществляли с помощью аналитических весов Sartorius (Германия). Дозирование реактивов и биоматериала по объему осуществляли с помощью дозаторов Eppendorf и Sartorius (Германия) объемом 20-200 мкл и 100 - 1000 мкл.

Реактивы. В работе использовали образец стандартный образец (СО) осельтамивира карбоксилат C₁₄H₂₄N₂O₄ (SynZeal Research Private Limited, Индия). Для приго-

Таблица 1 – Условия градиентного режима элюирования

Степень градиента	Время, мин	Доля элюента А (%)	Доля элюента Б (%)
0	0,00	70,0	30,0
1	1,00	70,0	30,0
2	1,01	2,00	98,0
3	3,00	2,00	98,0
4	3,01	70,0	30,0
5	5,00	70,0	30,0

Таблица 2 – Ионизационные LC-MS условия

LC/MS с масс-селективным детектором 6420A Triple Quad QQQ							
Расход газа-осушителя		11 мл/мин					
Давление распылителя		50 фунтов на кв.дюйм					
Температура газа – осушителя		340 °C					
Напряжение на входе в капилляр		4000 В					
Соединение	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage age	Polarity
OSTC	285.2	197.1	100	95	5	4	Positive
OSTC	285.2	138.1	100	95	17	4	Positive
OSTC	285.2	120.1	100	95	33	4	Positive
OSTC	285.2	94.1	100	95	33	4	Positive
OSTC	285.2	77.1	100	95	61	4	Positive

товления подвижной фазы использовали метанол марки HPLC Grade ($\geq 99,8\%$, HPLC grade, Германия), муравьиную кислоту ($\geq 98-100\%$ puriss. p.a., Индия), воду очищенную, полученную с помощью системы очистки воды Milli-Q ELIX, Франция.

Стандартные растворы OSTC хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8°C. Калибровочные растворы OSTC в плазме крови готовили в день использова-

ния. В качестве биологической матрицы использовали чистую донорскую плазму крови человека.

Пробоподготовка. Исходный раствор стандартного образца OSTC с концентрацией 10 мг/мл готовили растворением соответствующей навески в воде для хроматографии. В центрифужную микропробирку вместимостью 2 мл помещали 400 мкл плазмы крови, содержащей осельтамивир карбоксилат в разных концентрациях прибав-

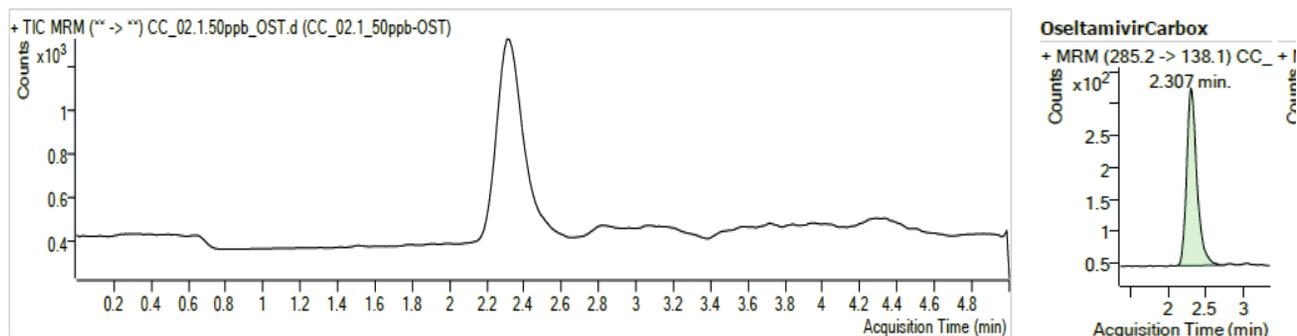
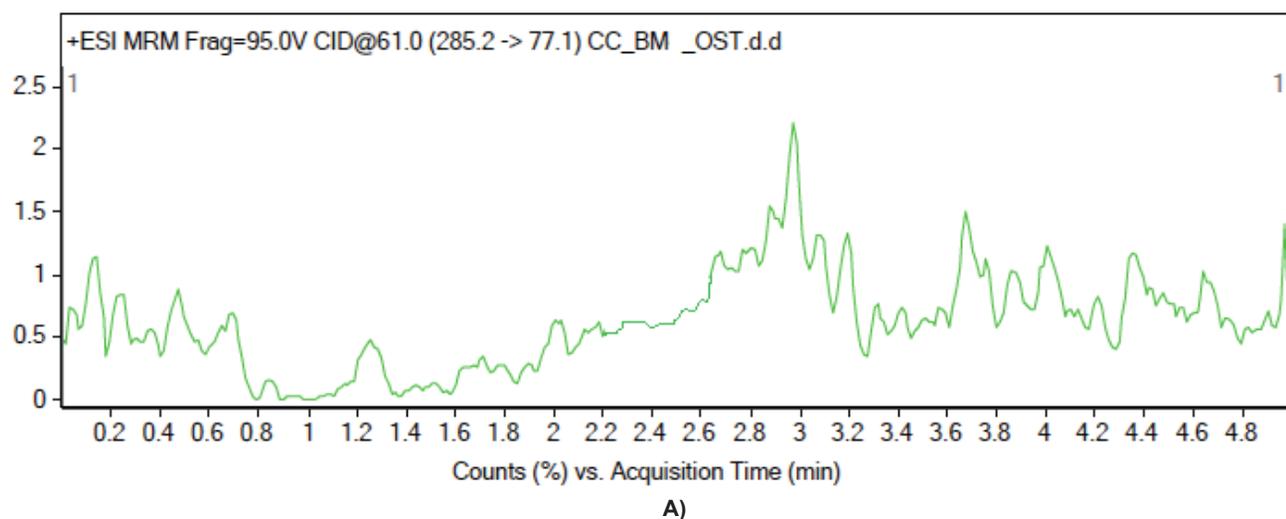
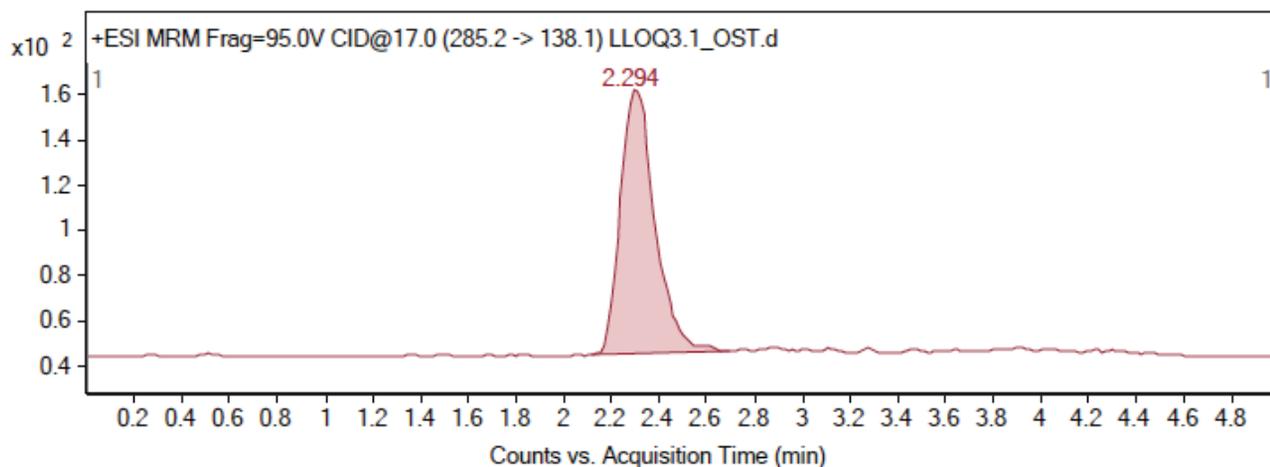


Рисунок 1 - Хроматограмма (а) и масс-спектры (б) OSTC в плазме



А)



Б)

Рисунок 2 - Хроматограмма плазмы, не содержащей раствор стандартного образца OSTC (а) и плазмы, содержащей раствор стандартного образца OSTC с концентрацией 10 нг/мл. По оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – площадь под хроматографическим пиком (mAU).

ляли 1 мл метанола и тщательно перемешивали на встряхивателе Heidolph Multi Reax в течение 120 с. Полученный раствор центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин дважды. Надосадочную жидкость использовали для хроматографического анализа.

Условия хроматографического анализа. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Zorbax C18 (1.8µm 50 x 2.1mm) с использованием системы Agilent LC/MS с масс-селективным детектором 6420A Triple Quad QQQ. В качестве подвижной фазы использовали раствор муравьиная кислота 0,1% - метанол. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.25 мл/мин,

температура колонки – 35°C, объем вводимой пробы – 5 мкл, время хроматографирования - 5 минут. Условия режима элюирования условия представлены в таблице 1. Детектирование проводили с помощью масс-спектрометрического детектора, тип ионизации –ES+APCI с m/z = 285,2 (OSTC). Сканирование осуществляли по селективно- выбранным ионам. Параметры работы детектора представлены в таблице 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию методики проводили согласно требованиям [3, 5], а также на основании руководства по валидации

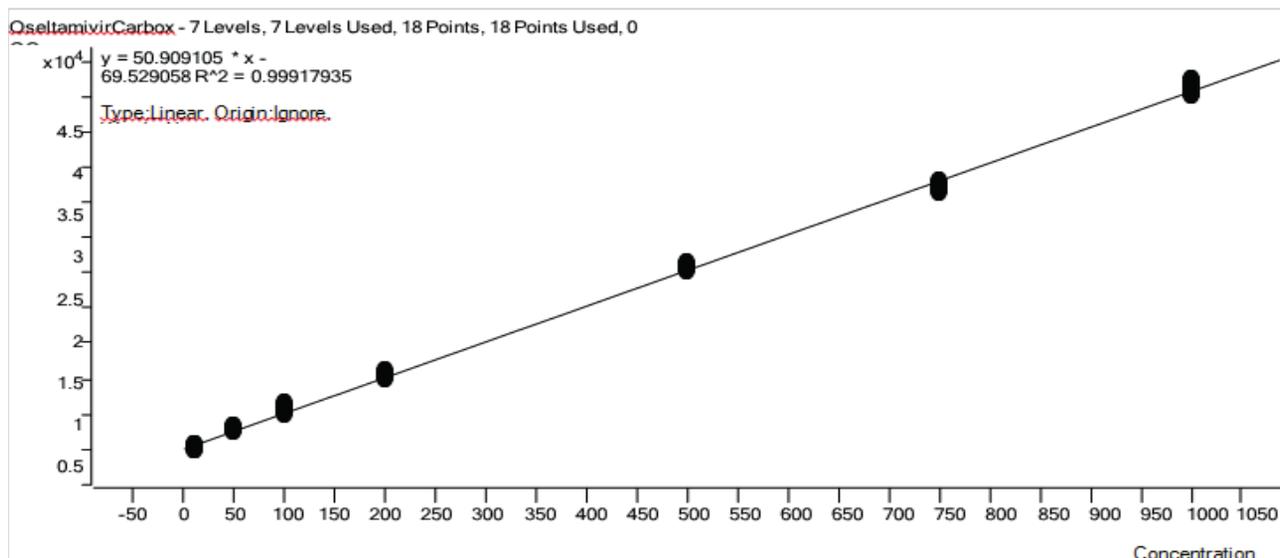


Рисунок 3 - Линейность методики определения OSTC в плазме крови в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нг/мл

Таблица 3 - Правильность и прецизионность методики определения OSTC в плазме крови (inter-day)

Концентрация С (нг/мл)	Найденное значение	Среднее Значение	RSD (%) (n=5)	CV (%)
10 LLOQ	10,23 8,01 10 9,3 8,7	9,25	0,92	9,92
30 LQC	30 29,44 28,31 27 31,07	29,16	1,57	5,37
300 MQCi	289,79 291,58 278 296,18 299,54	291,02	8,22	2,83
500 MQCi	477,04 483 495 490,03 494,29	487,87	7,71	1,58
750 HQC	747,14 738,55 762,1 753 754,68	751,09	8,81	1,17

Таблица 4 - Прецизионность методики определения OSTC в плазме (intra-day)

Концентрация С (нг/мл)	Найденное среднее значение				Критерий приемлемости
	День 1	День 2	День 3	CV (%)	
10 LLOQ	9,24	9,37	10,34	9,63	Не более 20%
30 LQC	29,16	28,96	29,36	4,26	Не более 15%
300 MQCi	291,01	290,25	300,07	4,16	Не более 15%
500 MQCi	487,87	490,23	503,24	3,04	Не более 15%
750 HQC	751,09	742,15	701,03	8,65	Не более 15%

Таблица 5 - Результаты оценки кратковременной температурной стабильности OSTC

№ раствора	Концентрация, нг/мл	
	LQC – 30,0	HQC -750,0
1	31,00	647,14
2	28,44	758,55
3	27,34	769,10
4	27,00	763,00
5	34,07	784,68
\bar{X}	29,57	744,49
δ , %	-1,43	-0,73
Критерий приемлемости $ \delta $, %	< 15	< 15
Вывод	Удовлетворяет	Удовлетворяет

Таблица 6 - Результаты оценки стабильности при замораживании/оттаивании OSTC

№ раствора	Концентрация (нг/мл)	
	LQC – 30,0	HQC- 750,0
1	35,20	759,14
2	28,35	719,55
3	29,42	782,10
4	31,40	763,00
5	33,07	754,68
\bar{X}	31,65	755,69
δ , %	5,49	0,76
Критерий приемлемости $ \delta $, %	< 15	< 15
Вывод	Удовлетворяет	Удовлетворяет

Таблица 7 - Стабильность растворов OSTC в авто сэмплере

№ раствора	Концентрация (нг/мл)	
	LQC - 30,0	HQC – 750,0
1	34,00	787,14
2	27,34	838,50
3	25,31	742,10
4	31,00	793,00
5	33,07	786,68
\bar{X}	30,14	789,48
δ , %	0,48	5,26
Критерий приемлемости $ \delta $, %	<15	<15
	Удовлетворяет	Удовлетворяет

биоаналитических методик FDA [9] и EMA [2] по следующим характеристикам: селективность, линейность, матричный эффект, правильность и прецизионность (inter-day и intra-day), нижний предел количественного определения (НПКО), перенос проб, прецизионность, воспроизводимость, стабильность растворов.

Применение в методике колонки Zorbax размером 50 × 2,1 мм, заполненной обращённо-фазовым сорбентом C18 с размером частиц 1,8 мкм, позволило получить удовлетворительную форму пиков OSTC (рисунок 1.).

Селективность

Для определения селективности методики были протестированы 6 образцов биологической матрицы (плазма крови из разных источников) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты плазмы крови, метаболиты, продукты деструкции и др.). Проводили анализ образцов бланковой плазмы, образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нг/мл.

На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания OSTC. На рисунке 2 представлены типичные хроматограммы интактной плазмы крови человека (а) и плазмы крови, содержащего 10 нг/мл OSTC (б). Из рисунков видно, что потенциально мешающие вещества не оказывают влияния на анализ OSTC.

Линейность

Для построения градуировочной кривой использовали рабочие растворы на семи уровнях концентраций в трех повторностях и бланк-матрица (чистая матрица). Проводили анализ 7 образцов чистой плазмы с прибавлением раствора стандартного образца OSTC получения концентраций: 10, 50, 100, 200, 500, 750, 1000 нг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график с коэффициентом корреляции $r^2 = 0,9991$ вместе с уравнением калибровочной кривой (рисунок 3). В диапазоне концентраций OSTC от 10 нг/мл до 1000 нг/мл получена линейная зависимость.

Отклонения концентраций калибровочных растворов соответствовали нормам EMA и FDA. Ошибка не превышала допустимых пределов – не более 20% для раствора НПКО, и не более 15% - для остальных точек. Исходя из этого методику количественного определения OSTC можно считать линейной.

Правильность и прецизионность

Правильность методики оценивали на образцах биологической матрицы с добавлением известных количеств аналита на уровнях концентраций: нижний предел количественного определения (НПКО) растворов контроля качества (LLOQ), 3*НПКО (LQC), первая средняя концентрация растворов контроля качества (MQCi), вторая средняя концентрация растворов контроля качества (MQC) и верхняя концентрация растворов контроля качества (HQC), которые получали независимо от растворов, приготовленных для подтверждения линейности методики. Растворы хроматографировали в пя-

ти повторностях. Анализ проводили в течение первого дня и второго дня. Правильность выражали в процентах от номинального значения OSTC. Для полученных значений были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности CV (%).

Результаты представлены в таблице 3. Полученные величины относительного стандартного отклонения соответствуют нормам EMA и FDA (не более 20% для раствора НПКО, и не более 15% - для других концентрационных точек).

Определение прецизионности методики проводили путем повторных измерений пяти концентраций (LLOQ, LQC, MQCi, MQC, HQC) OSTC в одном и том же образце по вышеописанной методике в четырех разных циклах. Все результаты были близки между собой (таблица 4).

Стабильность

Стабильность растворов была подтверждена для стандартных растворов при хранении в автосамплере, при температуре от 2 до 80С, кратковременная стабильность для приготовленных аналитов в течение 24 часов и 48 часов при анализе на следующий день на уровнях концентраций калибровочной кривой (10-1000 нг/мл). Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы с аналитом заданной концентрации были помещены в холодильник при температуре -700С, где хранились до окончания исследования. Установлено, что отклонения полученных значений концентраций варьирует в пределах допустимых норм и соответствует требованиям не более 15 %, что свидетельствует о стабильности образцов, содержащих OSTC в течение 24 часов при хранении в холодильнике, при комнатной температуре, при замораживании и оттаивании. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 15 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная методика количественного определения OSTC в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (LC-MS) проста в исполнении, соответствует требованиям валидационных характеристик и достоверно позволяет определять концентрацию осельтамивира карбоксилат в плазме крови в концентрациях от 10,0 нг/мл до 1000,0 нг/мл. Нижний предел количественного определения OSTC составил 10 нг/мл. Точность и прецизионность результатов анализа с учётом критериев приемлемости соблюдались во всем интервале исследуемых концентраций (10–750 нг/мл). При комнатной температуре исследуемые растворы стабильны после проб подготовки на протяжении 8 ч. Проведенные исследования доказывают, что разработанная методика количественного определения содержания OSTC в плазме крови методом ВЭЖХ-МС воспроизводима и позволяет получить достоверные результаты.

Методика была применена для изучения биоэквивалентности препарата лекарственных препаратов Осельта-

мивир-NOBEL® капсулы 75 мг (АО «Нобель Алматинская Фармацевтическая Фабрика», Республика Казахстан) и Тамифлю капсулы 75 мг (Делфарм Милано С.р.л.,

Италия) на здоровых добровольцах при приеме натоцка. Результаты проведенных исследований подтвердили биэквивалентность данных лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 L V Gubareva, L Kaiser, F G Hayden. Influenza virus neuraminidase inhibitors. Lancet. 2000 Mar 4;355(9206):827-35. doi: 10.1016/S0140-6736(99)11433-8.
- 2 «OECD Principles on Good Laboratory Practice» OECD Principles and Guidance for Compliance Monitoring – OECD, ENV/MC/CHEM(98)17
- 3 «Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», № 81от 3 ноября 2016 г.
- 4 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», № 85 от 3 ноября 2016 г
- 5 Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15. Приложение 1. Стандарт надлежащей лабораторной практики (GLP)
- 6 CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1/Corr**. Guideline on the Investigation of Bioequivalence (20 January 2010)
- 7 Additional guidance for organization performing in vivo bioequivalence studies (WHO TRS № 937, 2006, Annex 9)
- 8 Guideline on bioanalytical method validation. – EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2** – EMA , 2015
- 9 FDA Guidance for Industry "Bioanalytical Method validation" (May 2018) / FDA Руководство для промышленности «Валидация Биоаналитических методов» (Май 2018)
- 10 Shankrappa Janiwarad, Kashif Ul Haq, Dinesh Choudhary. A selective and Sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for simultaneous estimation of oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylic acid in human plasma for bioavailability or bioequivalence studies// Pharmaceutical ReseaRch Volume 3, Issue 3, 4598-4614.

REFERENCES

- 1 L V Gubareva, L Kaiser, F G Hayden. Influenza virus neuraminidase inhibitors. Lancet. 2000 Mar 4;355(9206):827-35. doi: 10.1016/S0140-6736(99)11433-8.
- 2 «OECD Principles on Good Laboratory Practice» OECD Principles and Guidance for Compliance Monitoring – OECD, ENV/MC/CHEM(98)17
- 3 «Pravila nadlezhashhej laboratornoj praktiki Evrazijskogo jekonomicheskogo sojuza v sfere obrashhenija lekarstvennyh sredstv», № 81ot 3 nojabrja 2016 g.
- 4 «Pravila provedenija issledovanij bioekvivalentnosti lekarstvennyh preparatov v ramkah Evrazijskogo jekonomicheskogo sojuza», № 85 ot 3 nojabrja 2016 g
- 5 Prikaz i.o. Ministra zdravoohranenija Respubliiki Kazahstan ot 4 fevralja 2021 goda № ҚР DSM-15. Prilozhenie 1. Standart nadlezhashhej laboratornoj praktiki (GLP)
- 6 CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1/Corr**. Guideline on the Investigation of Bioequivalence (20 January 2010)
- 7 Additional guidance for organization performing in vivo bioequivalence studies (WHO TRS № 937, 2006, Annex 9)
- 8 Guideline on bioanalytical method validation. – EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2** – EMA , 2015
- 9 FDA Guidance for Industry "Bioanalytical Method validation" (May 2018) / FDA Rukovodstvo dlja promyshlennosti «Validacija Bioanaliticheskikh metodov» (Maj 2018)
- 10 Shankrappa Janiwarad, Kashif Ul Haq, Dinesh Choudhary. A selective and Sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for simultaneous estimation of oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylic acid in human plasma for bioavailability or bioequivalence studies// Pharmaceutical ReseaRch Volume 3, Issue 3, 4598-4614.

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.

Конфликт интересов – не заявлен.

Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами.

При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами.

Финансирование – не проводилось.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ.

Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған. Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ.

Қаржыландыру жүргізілмеді.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

No conflicts of interest have been declared.

This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers.

There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work.

Funding - no funding was provided.

Сведения об авторах:

Шнауқшта Валентина Станиславовна - заведующий лабораторией фармакологических испытаний РГП на ПХВ "НЦЭЛС и МИ" КМ и ФК МЗ РК ТФ в г. Алматы, +7 707 750 87 81; +7 (727)233 0348, v.shnaukshta@dari.kz

Дуйсенова Маржан Усенқызы - специалист 1 категории лаборатории фармакологических испытаний РГП на ПХВ "НЦЭЛС и МИ" КМ и ФК МЗ РК ТФ в г. Алматы +7 (727)233 0348, m.duisenova@dari.kz

Ельжасова Ания Муратовна - специалист 2 категории лаборатории фармакологических испытаний РГП на ПХВ "НЦЭЛС и МИ" КМ и ФК МЗ РК ТФ в г. Алматы +7 (727)233 0348, a.elzhasova@dari.kz