

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2014

А. И. Платова¹, И. И. Мирошниченко¹, С. Н. Птицина¹, Н. И. Юрченко²

БЫСТРЫЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕТРОЗОЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.

¹ ФГБУ "Научный центр психического здоровья" Российской академии медицинских наук, 115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 34;

² ОАО химико-фармацевтический комбинат "Акрихин", бизнес-центр "Риверсайд Тауэрз", 115054, Россия, Москва, Космодамианская набережная, д. 52, стр. 5

Предложен валидированный метод количественного определения летрозолола (селективного нестероидного ингибитора ароматазы) в плазме крови человека посредством тандемной хроматомасс-спектрометрии. Предварительную обработку биообразцов осуществляли методом твердофазной экстракции с применением картриджей SOLA. Хроматографическое разделение проводили на колонке "Zorbax Bonus-RP" с составом подвижной фазы ацетонитрил — 0,2 % водный раствор муравьиной кислоты, соотношение 70:30 по объему; скорость подвижной фазы — 0,3 мл/мин. Для определения летрозолола использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр Agilent 6410-2K в режиме детектирования заданных масс (+MRM) для летрозолола (286,1 → 217,1 m/z), для внутреннего стандарта оланзапина (313 → 256 m/z) в условиях ионизации электрораспылением при напряжении + 4000 В. Калибровочная кривая для летрозолола в диапазоне концентраций 0,25 – 100 нг/мл имела линейный характер (коэффициент корреляции $R = 0,9998$, 95 % доверительный интервал: 0,9995 – 0,9976) с нижним пределом чувствительности 0,25 нг/мл. Валидация метода свидетельствовала о его высокой чувствительности, специфичности, точности и воспроизводимости, а также о стабильности аналита при различных условиях. Метод успешно применен к клиническим фармакокинетическим исследованиям.

Ключевые слова: летрозолол; тандемная хроматомасс-спектрометрия; твердофазная экстракция; режим детектирования заданных масс; электрораспыление; фармакокинетика.

Летрозолол (4-[(4-цианофенил)-(1,2,4-тиазолил)метил]бензонитрил — эффективный селективный нестероидный ингибитор ароматазы, участвующей в конверсии андрогенов в эстрогены. Летрозолол ингибирует ароматазу путем обратимого конкурентного связывания с гемом цитохрома P450 [1]. Препарат используют в терапии эстрогенположительного рака молочной железы у женщин в постменопаузе [2]. В пременопаузе, когда эстрогены продуцируются в яичниках, летрозолол не показан для медицинского применения [3].

В ранних исследованиях для количественного определения летрозолола использовали метод ВЭЖХ с УФ-детекцией [4]. Однако чувствительность этого метода недостаточна для фармакокинетических исследований. Преодолеть эти затруднения при количественном определении следовых количеств лекарственного вещества позволило сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией [5, 6]. К сожалению, методы определения содержания летрозолола посредством тандемной хроматомасс-спектрометрии (LC-MS/MS), описанные в литературе, достаточно специфичны: ис-

пользуются внутренние стандарты с изотопной меткой [7] или режим фотоионизации [8].

Наиболее широко применяемые методы пробоподготовки образцов плазмы крови — жидкостная и твердофазная экстракции. Твердофазная экстракция (ТФЭ) имеет определенные преимущества перед жидкостной, поскольку позволяет получить более чистые образцы, демонстрирует лучшую воспроизводимость и позволяет снизить объем требуемых растворителей [9, 10]. Данная работа посвящена разработке эффективного метода тандемной хроматомасс-спектрометрии для определения концентраций летрозолола в плазме крови человека с применением картриджей (патронов) SOLA при ТФЭ. Эти картриджи содержат смесь полиэтиленов и компоненты стационарной фазы. В качестве внутреннего стандарта использовали оланзапин.

Для целей настоящего исследования использована плазма крови, полученная от 32 здоровых женщин постклимактерического периода (возраст участниц составлял 51 ± 4 года), европейской расы. Заборы крови

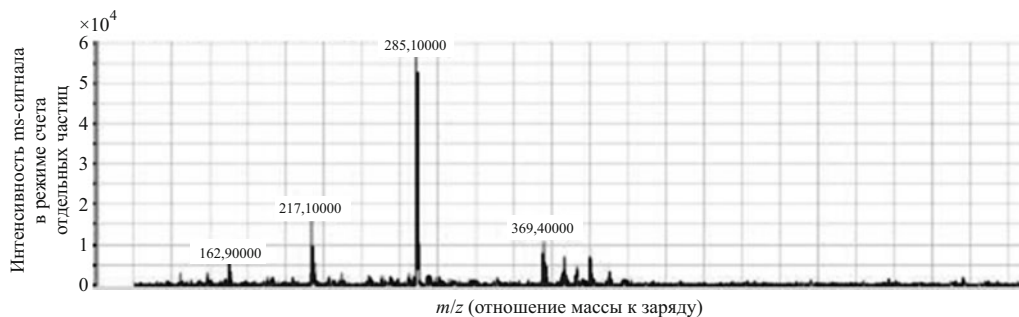


Рис. 1. Полный масс-спектр летрозола при сканировании по массам от 100 до 500 а.е.

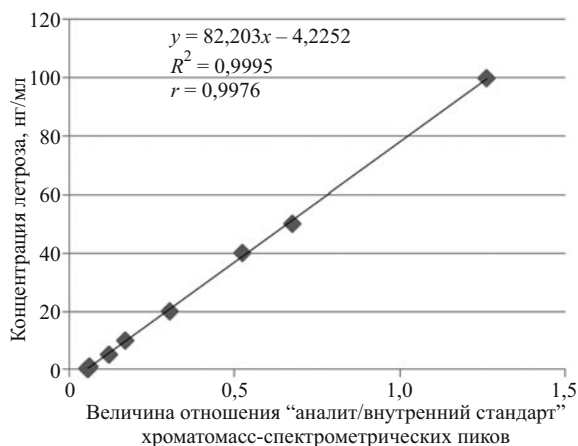


Рис. 2. Зависимость концентрации летрозола (добавленной к интактной плазме крови) от величины хроматографического отклика. По оси ординат — концентрация летрозола в нг/мл, по оси абсцисс — отношение площади пика летрозола к площади пика внутреннего стандарта. Границы 95 % доверительного интервала для коэффициента корреляции (r): 0,9975; 0,9999.

производились после подписания информированного согласия на участие в исследовании фармакокинетики. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом (ЛЭК) МУ ЦГБ г. Реутова.

Экспериментальная часть

Субстанция летрозола предоставлена ОАО “Акрихин”, Купавна, Московская область, оланзапин получен в ФГБУ “НЦПЗ” РАМН, Москва. Степень чистоты, заявленная в соответствующих сертификатах анализа субстанций, составила не менее 99,9 %.

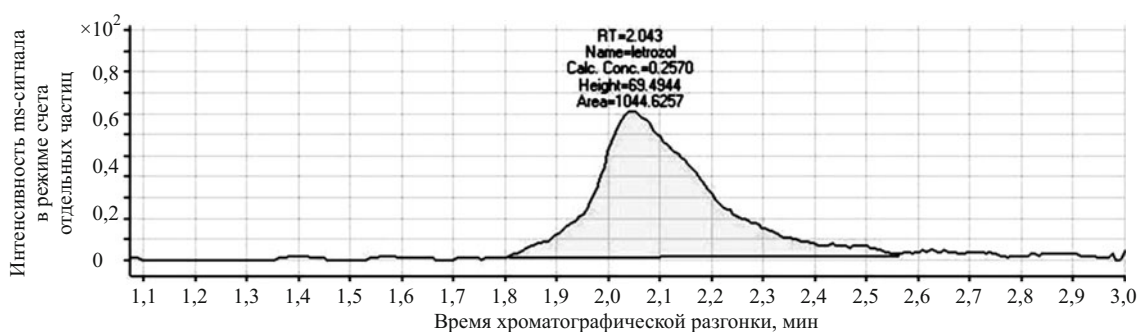


Рис. 3. MRM масс-хроматограмма. Предел количественного обнаружения (LLOQ) 0,25 нг/мл летрозола.

Остальные реактивы были аналитического качества: муравьиная кислота (Sigma Inc., США), метанол и ацетонитрил (Lab-Scan, Польша), деионизированная вода, полученная из дистиллированной воды с использованием системы Simplicity UV (Millipore, США). Патроны для ТФЭ: SOLA (Thermo Fisher Scientific Inc, США).

При твердофазной экстракции использовали вакуумный коллектор (Манифоулд 12 pos, Agilent). Для равномерного перемешивания проб использовали вибровстряхиватель фирмы Labomed (Германия), для производства азота особой чистоты — генератор NitroFlow®Lab фирмы Parker Filtration (Нидерланды). В исследовании также использовали электронные весы Ohaus Discovery (Ohaus Europe, Швейцария), рН-метр фирмы Mettler Toledo — pH Meter S20 (Швейцария) и концентратор образцов — TurboVap® LV (Caliper LifeSciences, США).

Условия LC-MS/MS. Анализ биопроб проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series LC (США), включающем дегазатор, бинарный насос, автоинжектор, термостаты автоинжектора и модуля колонок, спектрофотометрический детектор с переменной длиной волны в диапазоне 190 – 600 нм, совмещенный с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 6410 – 2K Triple Quad LC-MS(QQQ) (США) с использованием метода ионизации электрораспылением (источник ESI). Программное обеспечение Agilent MassHunter B.01.04.

Условия хроматографического анализа: стационарная фаза — колонка “Zorbax Bonus-RP” фирмы Agilent (США) (100 × 2,1 мм; 3,5 мкм) с предколонкой 12,5 × 4,6 мм. Подвижную фазу составляла смесь аце-

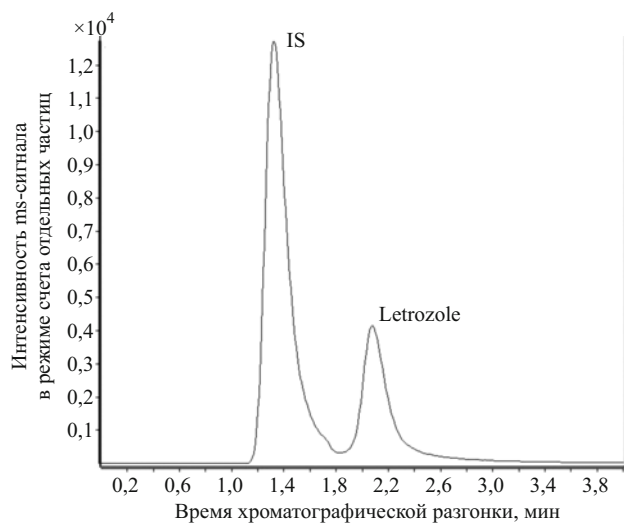


Рис. 4. Типичная MRM хроматограмма плазмы человека с содержанием летрозола (Letrozole, 32,4 нг/мл) и внутреннего стандарта (IS, 10 нг/мл).

тонитрила и 0,2 % раствор муравьиной кислоты в воде (70:30, v/v). Скорость подвижной фазы — 0,3 мл/мин; объем пробы, вводимой в аналитическую систему — 5 мкл; температура термостата колонки — 20 °С. В этих условиях время удерживания летрозола составило $2,1 \pm 0,02$ мин, оланзапина $1,3 \pm 0,02$ мин. Предел обнаружения в биообразцах для летрозола составил 0,25 нг/мл.

Детектор работал в режиме MRM (англ. multiple reaction monitoring, мониторинг заданных масс) с положительной ионизацией с использованием переходов для протонированных ионов летрозола ($286,1 \rightarrow 217,1$ m/z), ионов оланзапина ($313 \rightarrow 256$ m/z).

Масс-спектрометрические параметры оптимизировали введением стандартного раствора, содержащего аналит и оланзапин. Напряжение электрораспыления — 4000 вольт. В качестве распылителя использовали азот под давлением 25 psi. Десольватирующий газ (азот) нагревался до 350 °С при скорости потока 8 л/мин. Для диссоциации молекул в камере столкновения использовали азот высокой чистоты под давлением 0,15 МПа. Значения потенциала фрагментации и энергии столкновения были одинаковы, как для летрозола, так и для оланзапина, и составляли — 95 и 25 вольт соответственно.

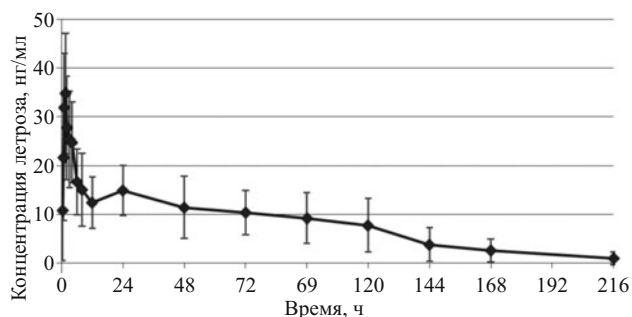


Рис. 5. Усредненный график “концентрация в плазме крови — время” после однократного перорального приема женщинами 2,5 мг летрозола. Концентрация представлена в виде “среднее арифметическое \pm стандартное отклонение”.

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества. Маточный раствор летрозола готовили в метаноле в концентрации 1,0 мг/мл, стандартные растворы (2,5; 5; 10; 50; 100; 250; 500 и 1000 нг/мл) — путем последовательного разведения маточного раствора метанолом. Растворы контроля качества (КК) низкой, средней и высокой концентрации (12,5; 150; 400 нг/мл) готовили подобным образом. Маточный раствор оланзапина (1 мг/мл) в метаноле разбавляли метанолом до конечной концентрации 100 нг/мл. Маточные растворы хранили при температуре 4 °С и использовали в течение 1 мес после приготовления. Калибровочные стандарты и образцы контроля качества готовили добавлением 50 мкл стандарта и 50 мкл раствора оланзапина к 500 мкл плазмы.

Обработка проб. Предварительная обработка (получение плазмы крови). Кровь в объеме 5 мл отбирали в стеклянные пробирки, обработанные K_2EDTA (двухкалиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Плазму отделяли центрифугированием (15 мин при 3000 об/мин). Промежуток времени между забором крови и ее обработкой не превышал 5 мин.

Замороженную плазму крови хранили при температуре не выше -20 °С до проведения анализа в лаборатории фармакокинетики, общая длительность составляла не более 3 недель.

Пробоподготовка в условиях лаборатории фармакокинетики. Полученные образцы плазмы крови участников исследования (500 мкл) переносили в 5,0 мл стеклянные пробирки и добавляли 50 мкл метанола, и

Таблица 1

Правильность и точность метода определения летрозола в плазме ($n = 5$)

Добавлено к плазме, нг/мл	Внутридневная			Междневная		
	Измеренная концентрация, нг/мл	Правильность, %	Точность CV	Измеренная концентрация, нг/мл	Правильность, %	Точность CV
1,5	1,46	-2,67	9,07	1,45	-3,33	9,41
15	16,03	6,87	5,33	16,09	7,27	7,16
40	38,44	-3,9	5,05	38,336	-4,16	6,28
Среднее арифметическое		0,10	6,48		-0,07	7,62
Стандартное отклонение		5,90	2,24		6,37	1,61

50 мкл стандарта (раствора оланзапина). Если раствор был непрозрачным, плазму подвергали воздействию ультразвука. Для твердофазной экстракции патроны SOLA последовательно промывали 500 мкл метанола, уравнивали 500 мкл воды, а затем загружали 500 мкл образцов плазмы. Затем патроны промывали 500 мкл 5 % метанола в воде. Элюирование целевого вещества осуществляли 500 мкл метанола. Элюент выпаривали в токе азота при 50 °С, растворяли в 200 мкл мобильной фазы и перемешивали на вибровстряхивателе в течение 10 с. Раствор переносили во флаконы автоинжектора и наносили на аналитическую колонку при объеме инъекции 5 мкл.

Метод валидации

Валидацию метода проводили в соответствии с требованиями к биоаналитическим методам, разработанными в Управлении по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США [11].

Селективность аналитического метода оценивали с использованием биологической матрицы (плазмы крови, не содержащей аналит), полученной от 6 отдельных доноров. Отклик сигнала интерферирующих пиков составил не более 10 % от нижнего предела количественного определения для летрозолола и 5 % для оланзапина.

Эффект матрицы при использовании методов масс-спектрометрии исследовали путем добавления аналита к подготовленным (экстрагированным) сериям образцов “бланк матрицы”, полученным от 6 отдельных доноров. Определяли 3 различных уровня концентрации летрозолола (1,25; 15 и 40 нг/мл) путем анализа 6 образцов на каждом уровне. Далее для этих 6 серий рассчитывали коэффициент вариации матричного фактора (МФ), нормализованного по внутреннему стандарту (оланзапин), который не превышал допустимый диапазон (15 %).

Для определения линейности использовали стандартные калибровочные кривые из 9 точек. Калибровочная кривая для летрозолола в диапазоне концентраций 0,25 – 100 нг/мл лучше всего описывалась полиномиальной функцией.

Правильность (accuracy) и точность (precision) метода в пределах 1 дня (intra-day) оценивали путем анализа 5 контрольных образцов летрозолола на 3 уровнях (1,25; 15 и 40 нг/мл). Правильность и точность в различные дни эксперимента (inter-day) определяли анализом 15 контрольных образцов в течение 3 последовательных дней. Для критерия отклонений значений для точности и правильности использовали 15 % интервал отклонений от реальных значений. При этом правильность определялась как процент отклонения найденных концентраций аналита к фактическим концентрациям в контрольных образцах. Точность (также называется сходимостью или прецизионностью) выражалась в виде коэффициента вариации (CV %) и отражала внутрисуточный и междневный разброс полученных результатов для каждой концентрации. Полученные результаты при расчете правильности и точности приведены в табл. 1.

Степень экстракции определяли путем сравнения средних площадей пиков экстрагируемых стандартных образцов контроля качества при низком, среднем и высоком уровне концентраций (1,25; 15 и 40 нг/мл) со средними площадями пиков стандартов в метаноле в тех же концентрациях.

Для определения чувствительности использовали самую низкую концентрацию на калибровочной кривой, при которой точность и правильность были меньше или равны 20 %, а соотношение сигнала к шуму (S/N) было > 10. Для оценки стабильности образцов при замораживании – оттаивании определяли стабильность контрольных образцов для 3 концентраций летрозолола в плазме после 3 циклов замораживания (–20 °С) и оттаивания (при комнатной температуре).

Результаты и их обсуждение

Условия анализа. Параметры определения летрозолола были тщательно оптимизированы. Оланзапин был отобран как внутренний стандарт, поскольку его хроматографическое поведение и эффективность экстракции были близки к таковым для определяемого вещества. Полный просканированный ионный спектр

Таблица 2

Линейность и точность построения калибровочной кривой

Калибровка (добавленная концентрация), нг/мл	Время удерживания, мин	Рассчитанная концентрация, нг/мл	Правильность, % отклонения	S/N летрозолол	Отношение площадей пиков летрозолол/оланзапин
0,25	2,04	0,22	– 13,81	11,72	0,052
0,50	2,04	0,46	– 7,01	20,75	0,055
1,00	2,06	0,94	– 6,24	31,22	0,061
5,00	2,08	5,53	10,55	39,38	0,118
10,00	2,06	9,69	– 3,07	39,61	0,169
20,00	2,05	20,62	3,08	75,80	0,304
40,00	2,06	38,41	– 3,99	100,68	0,523
50,00	2,03	50,93	1,86	127,52	0,675
100,00	2,07	99,98	– 0,02	187,58	1,264
Среднее арифметическое	2,05	25,20	– 0,02	70,47	0,36
Стандартное отклонение	0,02	32,54	0,03	44,50	0,39

летрозола представлен на рис. 1. Использовали MRM переход $286,1 \rightarrow 217,1$ m/z для количественного определения летрозола. Параметры массового перехода оптимизировали путем наблюдения максимального отклика для ионов-продуктов. Для определения оптимальной энергии фрагментации сравнили интенсивность отклика при различных ее значениях (50, 70, 90, 100, 120 и 150 Вольт) и установили оптимальную величину – 95 В.

Провели несколько серий исследований для достижения удовлетворительного хроматографического разделения и ионизационного отклика летрозола и оланзапина. На ионизацию и форму пиков влиял состав мобильной фазы. Предварительно были протестированы в качестве компонентов мобильной фазы метанол, ацетонитрил, ацетат аммония и муравьиная кислота в различных соотношениях. Установлено, что оптимальный результат дает использование мобильной фазы следующего состава: ацетонитрил и 0,2 % раствор муравьиной кислоты в воде (70:30, v/v).

Валидация. Установлено, что расположение точек на калибровочной кривой для стандартных образцов летрозола лучше всего описывается линейной зависимостью: $C = 82,203X - 4,225$, с коэффициентом корреляции 0,9998 (где X — отношение площадей под пиками летрозола и внутреннего стандарта, C — концентрация летрозола, нг/мл) (рис. 2). Линейность калибровочной кривой в диапазоне концентраций 0,25 – 100 нг летрозола на 1 мл плазмы характеризуется коэффициентом корреляции $r = 0,9998$. Калибровочная кривая показала хорошую правильность (% отклонения не превышает 15 % для всех концентраций) в интервале концентраций летрозола 0,25 – 100 нг/мл. (табл. 2).

Предел количественного определения для летрозола в плазме составил 0,25 нг/мл ($S/N = 11,72$) (рис. 3).

Пики коэкстрактивных веществ матрицы образцов не интерферировали с выходом целевого вещества. Степень экстракции для летрозола, как показали результаты, была удовлетворительной, точной и воспроизводимой и составила $87,06 \pm 1,36$ %. (табл. 3.)

Точность измерений для 3 концентраций летрозола (в пределах одного дня и в разные дни) ($CV, n = 5$) находилась в пределах нормы. Соответствующие данные для точности и правильности представлены в табл. 1.

На рис. 4 представлена типичная MRM хроматограмма образца плазмы крови женщины в постменопаузе спустя 40 мин после перорального приема 2,5 мг летрозола.

Селективность проверяли путем измерения 3 сыровоточных образцов разного происхождения, не содержащих летрозол. Ни в одном не было обнаружено значимого количества эндогенных веществ при времени удерживания на колонке 2,0 – 2,1 мин, соответствующему пику летрозола.

При определении матричного эффекта отношение площадей пиков летрозола в сыровоточном экстракте и мобильной фазе составило 96,4; 98,9 и 96,4 % при 1,25; 15 и 40 нг/мл соответственно. Данное обстоятельство позволяет сделать вывод о незначительном влиянии матрицы на хроматографический сигнал. Стабильность образцов во время проведения анализа обеспечивалась использованием термостатированного автоинжектора при температуре 10 °С. Аналит в 3 концентрациях был стабилен в плазме в течение 3 циклов замораживания (–20 °С) и оттаивания (при комнатной температуре). Длительная стабильность летрозола в течение 30 дней при –20 °С потенциально благоприятна для рутинного анализа при проведении исследований биодоступности и биоэквивалентности.

Фармакокинетическое исследование. Метод применили для определения концентрации летрозола в плазме крови человека в течение 216 ч после однократного перорального введения летрозола (Фемара® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, производства фирмы Новартис Фарма Штейн АГ, Штейн, Швейцария) в дозе 2,5 мг 32 женщинам в постменопаузе (возраст от 45 до 55 лет). На рис. 5. представлены усредненные профили концентраций летрозола в зависимости от времени. Для определения параметров фармакокинетики использовали некомпартментный метод интегральных моментов с помощью программы WinNonlin v5.2. Период полувыведения рассчитывался с помощью реализованного в этой программе алгоритма выбора точек на эмпирической кривой (англ. best fit) для расчета стадии финальной элиминации. Усредненные значения T_{max} (медиана) и C_{max} (среднее арифметическое) составили 1,5 ч (разброс: 0,66 – 4) и $41,3 \pm 8,5$ нг/мл соответственно. Период полувыведения в конечную фазу элиминации составил $35,7 \pm 18,6$ ч и системный клиренс — $1,65 \pm 0,8$ л/ч. Полученные данные согласуются с фармакокинетическими параметрами, полученными в других исследованиях в популяциях здоровых женщин постклимактерического периода [12 – 14]. Стоит отметить, что имеющаяся значительная вариабельность системного клиренса в этой популяции женщин не полностью объясняется наличием полиморфизма гена цитохрома P450 2A6, что обуславливает актуальность дальнейшего изучения факторов, оказывающих влияние на фармакокинетику летрозола [15].

Предложен чувствительный и специфичный метод определения летрозола в плазме крови человека. Интерференции, вызванной эндогенными веществами плазмы, не выявлено. Метод быстрый (время хроматографической разгонки около 3 мин), селективный и высокочувствительный с нижним пределом обнаружения летрозола в плазме 0,25 нг/мл. Короткое время

Таблица 3

Степень экстракции летрозола ($n = 3$)

Концентрация, нг/мл	% экстракции	Точность, CV %
1,5	86,35	7,51
15	86,20	2,40
40	88,63	3,44
Среднее арифметическое	87,06	4,45
Стандартное отклонение	1,36	2,70

анализа важно для большого числа проб. Применение твердофазной экстракции и SOLA картриджей обеспечило снижение количества загрязнителей, высокую скорость анализа и уменьшение объема растворителей. Метод пригоден для фармакокинетических исследований и определения биоэквивалентности препаратов, содержащих летрозол в качестве активного вещества.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Arora and J. F. Potter, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **4**, 611 – 616 (2004).
2. J. Bryant and N. Wolmark, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1855 – 1857 (2003).
3. C. Thomssena and N. Harbeckb, *Breast Care*, **5**, 345 – 351 (2010).
4. N. Mondal, T. K. Pal and S. K. Ghosal, *Acta Pol. Pharmaceut. Drug Res.*, **66**, 11 – 17 (2009).
5. И. И. Мирошниченко, *Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств*, Москва (2011), сс. 353 – 372.
6. M. Niwa, *Bioanalysis*, **4**, 213 – 20 (2012).
7. J. C. Precht, B. Ganchev, G. Heinkele, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 301 – 8 (2012).
8. E. R. Trösken, K. Fischer, W. Völkel and W. K. Lutz, *Toxicology*, **219**, 33 – 40 (2006).
9. Д. В. Рейхарт, В. В. Чистяков, *Хим.-фарм. журн.*, **43**(12), 39 – 46 (2009); *Pharm. Chem. J.*, **43**(12), 680 – 686 (2009).
10. Н. А. Алексеев, А. М. Дробышевский, Д. А. Рождественский, *Хим.-фарм. журн.*, **44**(12), 48 – 52 (2010); *Pharm. Chem. J.*, **44**(12), 697 – 701 (2011).
11. US Dep.of Health and Human Services, FDA, CDER, *Guidance for industry, bioanalytical method validation* (2001). Интернет-ресурс: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
12. H. Tani, Y. Shitara and T. Horie, *Pharmacokinetics Disposition*, **67**, 1017 – 1025 (2011).
13. MHRA, Public Assessment Report. Femara 2.5 mg Tablet PL 00101 / 0493. Интернет-ресурс: <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/1-unit1/documents/websiteresources/con2023055.pdf>.
14. FDA. Center for drug evaluation and research. NDA20-26. Clinical pharmacology and biopharmaceutical review(s) (1997). Интернет-ресурс: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/20726_FEMARA%202.5MG_BIOPHARMR.PDF.
15. Z.Desta, Y. Kreutz, A.T. Nguyen, et al., *Clin. Pharmacol Ther.*, **90**(5), 693 – 700 (2011).

Поступила 15.03.13

RAPID AND SENSITIVE LC-MS/MS ASSAY FOR THE QUANTITATION OF LETROZOLE USING SOLID-PHASE EXTRACTION FROM HUMAN BLOOD PLASMA WITH APPLICATION TO PHARMACOKINETICS STUDIES

A. I. Platova¹, I. I. Miroshnichenko¹, S. N. Ptitsina¹, and N. I. Yurchenko²

¹ Mental Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115522 Russia

² AKRIKHIN Chemical Pharmaceutical Company, Moscow, 115054 Russia

We have developed and validated a high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for analysis of the letrozole selective non-steroidal aromatase inhibitor) in human blood plasma. The analyte and internal standard (IS) olanzapine were extracted from human plasma by solid-phase extraction and separated on a Zorbax Bonus-RP column using acetonitrile – 0.2% formic acid (70 : 30 v/v) mixture as the mobile phase at a flow velocity of 0.3 mL/min. The detection was performed using Agilent 6410-2K spectrometer a turbo-spray ionization source and mass spectrometric positive multi-reaction-monitoring (+MRM) mode at a voltage of +4000 V for preset masses of letrozole (286.1 R 217.1 *m/z*) and IS olanzapine (313 R 256 *m/z*). The assay was linear over a concentration range of 0.25 – 100 ng/mL (correlation coefficient of R = 0.9998.95%; confidence interval, 0.9997 – 0.9998) with the lowest limit of quantification (LLOQ) of 0.25 ng/mL. The proposed method also afforded satisfactory results in terms of the sensitivity, specificity, precision (intra- and inter-day, CV < 10 %), accuracy, recovery as well as the stability of the analyte under various conditions. The method was successfully applied to clinical pharmacokinetics studies.

Keywords: letrozole; human blood plasma; solid-phase extraction; LC-MS/MS; preset mass detection; electrospray; pharmacokinetics