

А. Л. Хохлов^{1, 2}, Ю. А. Джурко², Л. Н. Шумов^{1, 2}, V. Kubeš², M. Ryska²,
И. И. Яичков^{1, 2}, А. М. Шумова², В. Н. Шабров², А. Е. Мирошников¹

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОФЕНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

¹ ГБОУ ВПО Ярославский государственный медицинский университет МЗ РФ, Россия, 150000, Ярославль, ул. Революционная, 5.

² ООО «Квинта — Аналитика Ярославль», Россия, 150045, Ярославль, Ленинградский пр-т, 52г.

Разработана новая экспрессная и точная методика определения концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Для пробоподготовки использовалась депротенизация. Валидацию методики проводили в соответствии с Руководством по валидации биоаналитических методов ЕМЕА и Руководством по экспертизе лекарственных средств. Данная методика использована для исследования фармакокинетики микофенолата натрия.

Ключевые слова: микофеноловая кислота; депротенизация; ВЭЖХ-МС/МС; валидация; фармакокинетика.

Микофенолат натрия является иммуносупрессивным препаратом, механизм действия которого связан с селективным, обратимым и конкурентным ингибированием фермента инозинмонофосфатдегидрогеназы, необходимого для синтеза гуанозина, а также внедрению его в молекулу ДНК. В результате подавляется рост и деление лимфоцитов, индуцируется их апоптоз, что приводит к снижению иммунного ответа [1]. Биодоступность микофенолата натрия составляет 72 %, степень абсорбции — 93 %, время наступления максимальной концентрации — 1,5–2 ч, период полувыведения — 11,7 ч [2]. Данный препарат используется при трансплантации почки для предотвращения отторжения в комбинации с циклоспорином А и глюкокортикоидными [3].

Основным методом анализа при биоаналитических исследованиях является ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, использование которой позволяет минимизировать пробоподготовку и увеличить производительность аналитических процедур [4–6]. Известны ВЭЖХ-МС/МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме крови с использованием депротенизации и твёрдофазной экстракции [7–13]. Однако влияние обратной конверсии фенольного глюкуронида лекарственного вещества в процессе хранения на точность количественного определения не изучено.

Цель данной работы — разработка новой точной и экспрессной методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

Экспериментальная часть

В качестве стандартного образца определяемого вещества использовался микофенолат натрия (Emsure Pharmaceuticals Limited, Индия), в качестве внутреннего стандарта — дейтерированная микофеноловая ки-

слота (TLC Pharmachem, Канада); для испытания обратной конверсии метаболита использован стандартный образец глюкуронида микофеноловой кислоты (TLC Pharmachem, Канада). Структурные формулы данных соединений представлены на рис. 1. В работе использовали следующие химические реактивы: ацетонитрил для ВЭЖХ (Merck, Германия), вода ультрачистая, полученная с помощью системы Direct Q3 UV. Исследование проводили на ВЭЖХ-МС/МС-системе, включающей трёхквadrupольный масс-спектрометрический детектор Thermo Scientific TSQ Quantum Discovery Max, оборудованный источником электрораспылительной ионизации с термофокусировкой, 2 насоса Flux Instruments 2200 Rheos, автоматический пробоотборник CTC Analytics PAL HTS, десятипортовый переключающийся кран Alltech Select Pro.

Условия хроматомасс-спектрометрического определения. Разделение компонентов биологической матрицы проводилось на колонке Phenomenex Kinetex C18 (30 × 4,6 мм, 2,6 мкм) с предколонкой Phenomenex Security guard C18, 4 × 3 мм с использованием подвижной фазы на основе ацетонитрила и воды при градиентном режиме элюирования. Объём вводимой пробы составил 5 мкл, анализ выполнялся при комнатной температуре. Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось в режиме регистрации отрицательных ионов в режиме MRM по 2 MRM-переходам: для микофеноловой кислоты m/z 319 → 191 и 319 → 205; для дейтерированной микофеноловой кислоты m/z 322 → 191, 322 → 205.

Подготовку пробы проводили методом депротенизации. В микропробирку помещали 50 мкл плазмы и 450 мкл раствора дейтерированного стандарта микофеноловой кислоты в ацетонитриле. Полученную смесь встряхивали на вортексе около 30 с при частоте около 1800 мин⁻¹, затем центрифугировали в течение 10 мин при 2500 об/мин. Затем надосадочную жидкость подвергали анализу в указанных выше условиях.

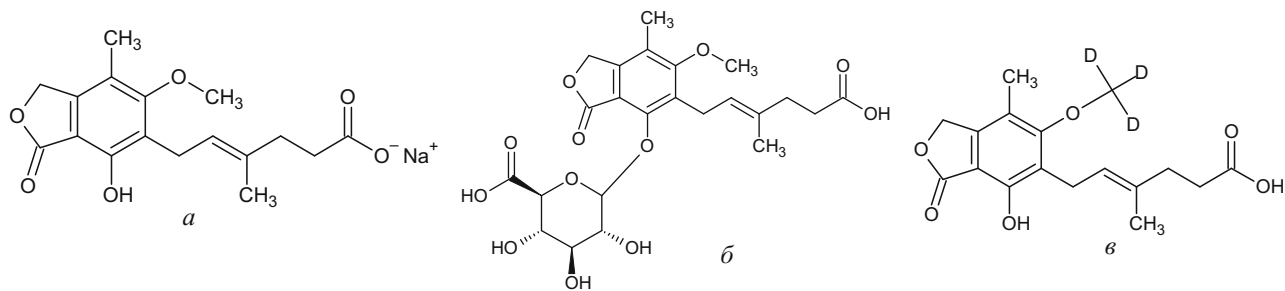


Рис. 1. Структурные формулы микофенолата натрия (а), её глюкуроида (б) и дейтерированной микофеноловой кислоты (в).

Калибровочные образцы и образцы контроля качества готовились добавлением к бланковой плазме стандартных растворов микофеноловой кислоты. Её концентрации в калибровочных образцах составили 0,5, 1, 4, 8, 12, 18, 24, 30 мкг/мл. Депроотеинизацию каждого образца проводили раствором дейтерированного внутреннего стандарта. Образцы контроля качества готовили в 3 концентрациях: 1,50 мкг/мл (образец контроля качества с низкой концентрацией), 15,00 мкг/мл (образец контроля качества со средней концентрацией), 22,50 мкг/мл (образец контроля качества с высокой концентрацией). Порядок приготовления аналогичен порядку приготовления калибровочных образцов.

Валидацию аналитической методики выполняли в соответствии с Руководством по валидации биоаналитических методов ЕМЕА [14] и Руководством по экспертизе лекарственных средств [15].

Для оценки селективности образцы пустой плазмы, полученные из 6 независимых источников (плазма различных типов, включая гемолизованную), исследовались на наличие хроматографических пиков эндогенных веществ области времени удерживания микофеноловой кислоты и внутреннего стандарта (рис. 2). Далее к 6 независимым образцам прибавляли микофеноловую кислоту и внутренний стандарт на уровне нижнего предела количественного определения (LLOQ 0,5 мкг/мл). Данные образцы были обработаны и измерены в рамках 1 серии, содержащей калибровочную кривую. Правильность составила 104,85 %, прецизионность (CV) — 7,45 %, что соответствует критериям приемлемости, в соответствии с которыми

правильность находится в диапазоне от 80,00 до 120,00 %, коэффициент вариации не превышает 20,00 %. Значения площадей пиков эндогенных соединений в месте выхода микофеноловой кислоты составляли менее 20 % от значений площадей пиков аналита на уровне LLOQ.

Линейность калибровочной кривой оценивали в диапазоне концентраций 0,50 – 30,00 мкг/мл плазмы в 8 точках по 6 повторений. Калибровочная кривая, представленная на рис. 3, строилась с использованием метода взвешенного регрессионного анализа. Коэффициент корреляции калибровочной кривой находился в диапазоне от 0,9985 до 0,9996, что свидетельствует о линейной зависимости соотношения площадей пиков “аналит/внутренний стандарт” от концентрации микофеноловой кислоты. Нижний предел количественного определения составил 0,5 мкг/мл.

Прецизионность и правильность метода оценивали на 6 концентрациях: 0,5, 1,5, 5, 15, 22,5, 30 мкг/мл. При выполнении оценки межсерийной прецизионности и правильности между сериями результаты внутрисерийных тестов, проведенных в разные дни, сравнивались между собой. Прецизионность метода выражалась коэффициентами вариации. Правильность оценивали сравнением отношения значения, полученного по результатам измерения, и номинального значения. Данные исследования внутрисерийной и межсерийной правильности и прецизионности приведены в табл. 1. Полученные результаты отвечают критериям

Таблица 1
Оценка прецизионности и правильности методики

Прецизионность и правильность	Концентрация, мкг/мл					
	0,50	1,50	5,00	15,00	22,50	30,00
Внутрисерийная						
Среднее	0,54	1,67	5,33	16,93	24,29	31,91
SD	0,02	0,08	0,14	0,74	0,97	1,44
CV, %	4,42	4,62	2,54	4,36	4,01	4,52
Правильность, %	108,62	111,38	106,67	112,85	107,96	106,37
Межсерийная						
Среднее	0,51	1,56	5,19	15,45	22,88	29,93
SD	0,03	0,12	0,18	1,39	1,57	2,24
CV, %	6,75	7,63	3,42	9,01	6,87	7,48
Правильность, %	102,78	104,04	103,83	103,03	101,70	99,76

Таблица 2
Оценка стабильности микофеноловой кислоты в плазме крови

Показатель	Исходные значения	Краткосрочная стабильность (через 24 часа)	Долгосрочная стабильность		Стабильность при замораживании/размораживании
			37 дней	119 дней	
Концентрация 1,50 мкг/мл					
Среднее	1,67	1,49	1,51	1,55	1,58
CV, %	4,62	4,04	5,72	4,23	5,47
Номинальная концентрация, %	111,38	99,18	100,38	103,24	105,10
Концентрация 22,50 мкг/мл					
Среднее	24,29	22,38	21,33	22,69	23,30
CV, %	4,01	4,51	2,44	2,82	3,72
Номинальная концентрация, %	107,96	99,46	94,79	100,86	103,55

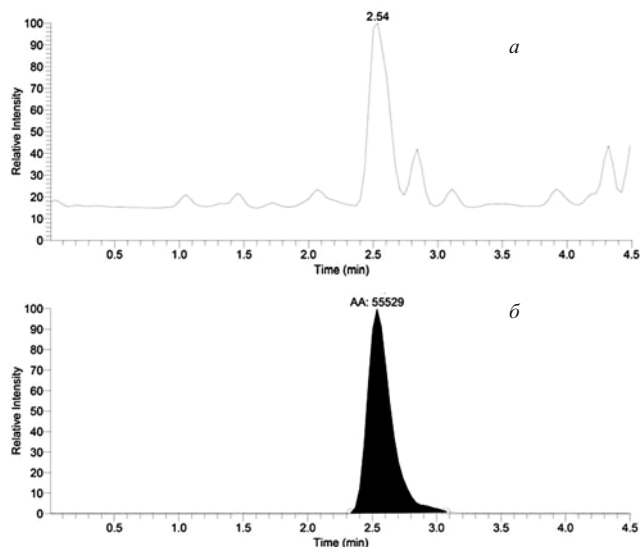


Рис. 2. Примеры хроматограмм: чистой плазмы (а), плазмы с добавлением микофеноловой кислоты на уровне LLOQ (б).

приемлемости — правильность находится в диапазоне от 85,00 до 115,00 %, коэффициент вариации не превышает 15,00 %. Данные критерии применялись к остальным валидационным испытаниям.

Для оценки эффекта переноса после ввода калибровочного образца наивысшей концентрации проанализированы 3 пробы, полученные из бланковой плазмы, оценивали отклик микофеноловой кислоты и внутреннего стандарта. На полученных хроматограммах отсутствовали пики данных веществ, следовательно, во введении пустой плазмы между анализами необходимости не возникает.

Степень извлечения оценивали анализом 2 видов образцов на 2 уровнях концентраций — 1,5 и 22,5 мкг/мл. Для приготовления 1-го вида растворов бланковой плазмы, которые подвергалась осаждению, добавляли растворы аналита и внутреннего стандарта. Для приготовления 2-го вида раствора бланковую плазму с внесённым раствором микофеноловой кислоты подвергали депротеинизации, затем к супернатанту прибавляли раствор дейтерированного стандарта. Оценивали соотношение отклика аналита и внутреннего стандарта. Степень извлечения при концентрации 1,5 мкг/мл составила 84,18 %, при концентрации 22,5 мкг/мл — 90,33 %.

Для подтверждения отсутствия влияния разведения 6 образцов плазмы с добавлением микофеноловой кислоты в концентрации 45 мкг/мл разводили в 2 раза пустой плазмой и анализировали. Расчёт произведён по калибровочному графику. В результате правиль-

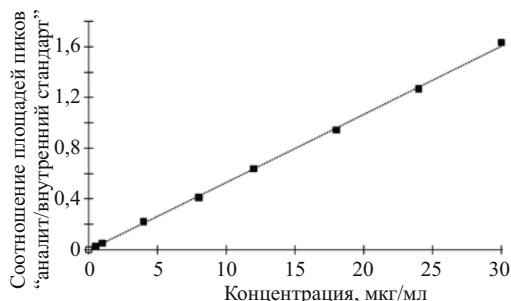


Рис. 3. Зависимость соотношения площадей пиков “аналит/внутренний стандарт” от концентрации микофеноловой кислоты.

ность расчёта концентраций составила 100,16 %, что соответствует критериям приемлемости.

Для оценки влияния матрицы на детекцию аналита и внутреннего стандарта исследованы 6 образцов плазмы из независимых источников (плазма различных типов, включая гемолизованную) на уровне низких (1,5 мкг/мл) и высоких (22,5 мкг/мл) концентраций, а также 6 измерений стандартных растворов. Нормализованный фактор матрицы рассчитывали как отношения площадей пиков аналита и внутреннего стандарта в плазме, деленные на отношения площадей пиков аналита и внутреннего стандарта в растворе. Он составил 0,892 для низких концентраций и 0,877 для высоких концентраций аналита. Коэффициент вариации в плазме при 1,5 мкг/мл концентрации — 11,94 %, при концентрации 22,5 мкг/мл — 1,92 %, что соответствует критериям приемлемости.

Проведена оценка краткосрочной стабильности, долгосрочной стабильности в замороженной плазме, стабильности при замораживании/размораживании микофеноловой кислоты. Для оценки стабильности анализировали 6 образцов плазмы с добавленным аналитом в концентрациях 1,5 и 22,5 мкг/мл спустя 24 ч (краткосрочная), спустя 37 дней и 119 дней после хранения при температуре не выше – 20 °С (долгосрочная стабильность) и после 3 циклов замораживания/размораживания. Полученные данные представлены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что полученные результаты отвечают критериям приемлемости.

Конъюгат микофеноловой кислоты с глюкуроновой кислотой обладает способностью к обратной конверсии [16]. Для оценки степени обратной конверсии бланковая плазма с добавлением фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты исследована в исходный момент времени и после 24 ч хранения при лабораторной температуре. Концентрация метаболита в плазме составляла 100 мкг/мл плазмы, что соответствует ожидаемым максимальным концентрациям этого метаболита в образцах от добровольцев. Сравнивали отклики микофеноловой кислоты в свежеприготовленных образцах, содержащих её глюкуронид, и аналогичных образцах после 24 ч хранения. Значимой обратной конверсии метаболита в исходное соединение через 24 ч не наблюдалось, полученные значения концентрации микофеноловой кислоты составили 2,58 % от нижнего предела количественного определения.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры микофеноловой кислоты

Параметр	C_{\max} , мкг/мл	T_{\max} , ч	AUC_{0-t} , мкг · ч/мл	C_{\max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹
M ± SD	12,29 ± 5,53	2,9 ± 2,4	22,90 ± 11,11	0,5591 ± 0,1812
Min	1,15	1,0	6,90	0,1667
Max	23,34	18,0	57,32	0,9939

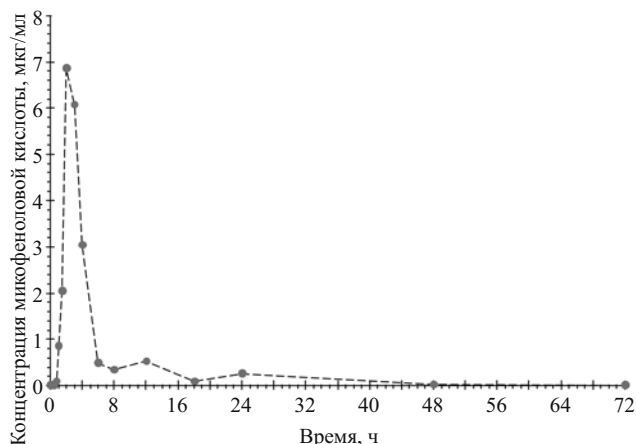


Рис. 4. Усреднённая фармакокинетическая кривая микофеноловой кислоты.

Фармакокинетика. В рамках проверки пригодности методики для изучения биоэквивалентности проведено исследование фармакокинетики препарата “Майфортик” (номер серии S0347, дата 12.2014). Значения концентраций микофеноловой кислоты в плазме крови были измерены у 48 здоровых добровольцев, мужчин и женщин в возрасте от 18 до 45 лет, после однократного приёма 360 мг микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой. Образцы крови отбирали до приёма препарата и через 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48 и 72 ч после приёма препарата. Усреднённая фармакокинетическая кривая представлена на рис. 4. Фармакокинетические параметры представлены в табл. 3. Полученное среднее значение максимальной концентрации аналита в плазме составило 12,29 мкг/мл, следовательно, выбранное значение LLOQ находится ниже, чем 5 % от C_{max} . Таким образом, разработанная методика пригодна для исследований биоэквивалентности.

Результаты и их обсуждение

Таким образом, разработанная экспрессная методика количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС отвечает необходимым современным требованиям, предъявляемым к бионалитическим исследованиям. Данная методика соответствует критери-

ям приемлемости по показателям: селективность, линейность калибровочной кривой, внутрисерийная и межсерийная прецизионность и правильность, эффект переноса, влияние эффекта матрицы, краткосрочная и долгосрочная стабильность. Кроме того, выполнена оценка влияния обратной конверсии метаболита на правильность результатов исследования. Данная методика использована для изучения фармакокинетики микофеноловой кислоты в таблетках, покрытых кишечнорастворимой оболочкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Salvadori, H. Holzer, A. Mattos, et al., *Am. J. Transpl.*, **4**, 231 – 236 (2003).
2. K. M. Tornatore, C. J. Meaney, G. E. Wilding, et al., *Clin. Pharmacokin.*, **54**, 423 – 434 (2015).
3. K. F. Parsons, J. Iran, M. Fall, et al., *Pocket Guidelines*, European Association of Urology (2014), pp. 348 – 350.
4. Т. А. Родина, Е. С. Мельников, А. В. Соколов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **50**(6), 52 – 56 (2016); *Pharm. Chem. J.*, **50**(6), 419 – 423 (2016).
5. Е. С. Степанова, М. В. Овчаров, С. С. Барсегян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **50**(3), 42 – 46 (2016); *Pharm. Chem. J.*, **50**(3), 195 – 199 (2016).
6. Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, Л. А. Меньшикова и др. *Хим.-фарм. журн.*, **49**(3), 46 – 49 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(3), 199 – 202 (2015).
7. H. Benech, S. Hascoet, V. Furlan, et al., *J. Chromatogr. B*, **853**, 168 – 174 (2007).
8. G. Brandhorst, F. Streit, S. Goetze, et al., *Clin. Chem.*, **52**, 1962 – 1964 (2006).
9. A.-S.C. Decavele, N. Favoreel, F. V. Heyden, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, **49**, 1159 – 1165 (2011).
10. T. Fleischmann, J. Merdink, S. Faulconbridge, et al., *Cur. Sep. Drug. Devel.*, **22**, 27 – 29 (2007).
11. J. Klepacki, J. Klawitter, J. Bendrick-Peart, et al., *J. Chromatogr. B*, **884**, 113 – 119 (2012).
12. V. Upadhyay, V. Trivedi, G. Shah, et al., *J. Pharm. Anal.*, **4**, 205 – 216 (2013).
13. T. M. Annesley, L. T. Clayton, *Clin. Chem.*, **51**, 872 – 877 (2005).
14. *Guideline on validation of bioanalytical methods (draft)*, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London (2009).
15. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, т. 1, Гриф и К, Москва (2013).
16. W. Li, J. Zhang, F. L. S. Tse, *Biomed. Chromatogr.*, **25**, 258 – 277 (2011).

Поступила 13.09.16

QUANTITATIVE DETERMINATION OF MYCOPHENOLIC ACID IN HUMAN BLOOD PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS-SPECTROMETRIC DETECTION

A. L. Khokhlov^{1,2}, Y. A. Dzhurko², L. N. Shitov^{1,2}, V. Kubel², M. Ryska², I. I. Yaichkov^{1,2}, A. M. Shitova², V. N. Shabrov², and A. E. Miroshnikov¹

¹ Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, 150000 Russia

² Quinta-Analytica Yaroslavl Company, Yaroslavl, 150045 Russia

The new rapid, selective and stable method has been developed for determining the concentration of mycophenolic acid in blood plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS) using deproteinization for sample preparation. Validation of the procedure was conducted in accordance with the Guidelines for Validation of Bioanalytical methods (EMEA) and Guidelines for Examination of Drugs. The procedure has been used to study the pharmacokinetics of mycophenolate sodium.

Keywords: mycophenolic acid; deproteinization; HPLC-MS/MS; validation; pharmacokinetics.