

К. М. Церковная^{1*}, Е. В. Флисюк¹, В. Н. Шабров²

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ МЕТАБОЛИТА САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А.
² ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», Россия, 150045, Ярославль, Ленинградский пр-т, д. 52Г.
* e-mail: ksenia.kirillova@spcru.ru

В ходе данного исследования разработана и валидирована аналитическая методика количественного определения ацетилсалициловой кислоты (АСА) как антиагрегантного средства и ее метаболита салициловой кислоты (СА) в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Установлен оптимальный диапазон концентраций для АСА (0,020 – 1,200 мкг/мл) и СА (0,200 – 12,000 мкг/мл), подобраны оптимальные условия пробоподготовки методом жидкость-жидкостной экстракции этилацетатом с последующим удалением растворителя в токе азота и перерастворением сухого остатка (с целью концентрирования пробы для повышения чувствительности методики), хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования. Разработанная методика может быть использована в дальнейшем при проведении фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота; плазма крови человека; ВЭЖХ-МС/МС; валидация; биоэквивалентность.

Для профилактики тромбообразования и осложненной ишемической болезни сердца в кардиологической практике широко применяются препараты ацетилсалициловой кислоты (АСА) как антиагрегантного средства. В мировой и российской практике проводятся фармакокинетические исследования АСА. В соответствии с требованиями FDA, при проведении фармакокинетических исследований лекарственных препаратов, содержащих АСА, необходимо определение не только нативного соединения, но и метаболита — салициловой кислоты (СА) [1]. Целью данного исследования являлась разработка и валидация аналитической методики количественного определения АСА и СА в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Преимуществом разработанной методики является совместная пробоподготовка АСА и СА. Кроме того, в качестве внутренних стандартов (ВС) использовались дейтерированные ацетилсалициловая кислота-d₄ (dASA) и салициловая кислота-d₆ (dSA), обеспечивающие высокую точность полученных результатов.

Экспериментальная часть

В ходе исследования использовались следующие реактивы и материалы: метанол (MeOH), для ВЭЖХ;

ацетонитрил (ACN), для ВЭЖХ; кислота муравьиная (НСООН), ч.д.а.; кислота фосфорная (Н₃РO₄), для ВЭЖХ; этилацетат (С₄Н₈О₂), для ВЭЖХ; изопропанол (iPrOH), для ВЭЖХ; вода ультрачистая, полученная с помощью системы очистки воды Direct Q3 UV; плазма крови человека с калия оксалатом (К₂С₂О₄, антикоагулянт) и натрия фторидом (NaF, консервант); полипропиленовые (ПП) пробирки и пробирки типа “Эппендорф”; полипропиленовые планшеты Waters, 1 мл.

Исследование проводили на системе ВЭЖХ-МС/МС, содержащей 2 насоса RHEOS 2200 (Flux Instruments), автоматический пробоотборник PAL HTS (CTC Analytics) с 10-портовым краном и 3-кварцупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific). Хроматографическое разделение осуществляли на колонке размером 150 × 4,6 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом фенил-гексилон с размером частиц 5 мкм (Luna 5 μm, Phenyl-Hexyl, 100 Å, 150 × 4,6 mm, Phenomenex). Подвижная фаза: ацетонитрил — 50 %; изопропанол — 10 %; 0,1 % НСООН — 10 %, вода ультрачистая — 30 %. Измерения проводили при изократическом режиме элюирования со скоростью потока 400 мкл/мин. Детекцию аналита проводили на масс-спектрометре TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific), с ионизацией в нагреваемом электроспрее (H-ESI). Анализатор настроен на мониторинг выбранных реакций перехода исходных ионов в дочерние (табл. 1).

Приготовление калибровочных и валидационных растворов

Для приготовления калибровочных и валидационных растворов использовался стандартный образец

Таблица 1

Мониторинг выбранных реакций (переход масс)

Аналит	АСА	dASA	СА	dSA
Исходный ион, m/z	179	183	137	141
Дочерний ион, m/z	137	141	93	97

ASA (USP, Канада, чистота 99,4 %), стандартный образец SA (Sigma-Aldrich, США, чистота 99,0 %) и BC — дейтерированная ацетилсалициловая кислота-d₄ (dASA, TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Канада) и дейтерированная салициловая кислота-d₆ (dSA, ISOTEC Sigma-Aldrich Family, США). Основные стандартные растворы ASA и SA готовили путем растворения навесок субстанций в растворе 2 % HCOOH — MeOH. Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения основных растворов этим же растворителем до необходимых концентраций. Определение концентраций проводилось в пределах установленного диапазона: для ASA нижний и верхний пределы количественного определения (НПКО и ВПКО соответственно) составили 0,020–1,200 мкг/мл, для SA — 0,200–12,000 мкг/мл (табл. 2, 3). Концентрация в рабочем растворе BC для dASA составляла 3,000 мкг/мл, для dSA — 12,000 мкг/мл.

Пробоподготовка

Для пробоподготовки использовалась плазма крови здоровых добровольцев, полученная путем отбора в вакуумные центрифужные пробирки, содержащие натрия фторид (консервант) и калия оксалат (антикоагулянт), с помощью постоянного катетера, установленного в вену. Для разделения фракций крови и отделения плазмы пробирки подвергались центрифугированию в режиме 3500 об/мин в течение 10 мин. Приготовление пула плазмы осуществлялось следующим образом: в полипропиленовую пробирку дозатором помещали 380 мкл плазмы, добавляли 20 мкл соответствующего рабочего раствора (K1–K8, Q1–Q6) и 400 мкл 2 % H₃PO₄, пробирку закупоривали, и содержимое перемешивали с помощью вортекса в течение 5 с при частоте встряхиваний 2200 мин⁻¹. Далее следовала процедура приготовления образца: в полипропиленовые пробирки дозатором помещали по 500 мкл пула плазмы, затем добавляли по 25 мкл рабочего раствора BC P-dASA/dSA и 900 мкл этилацетата. Пробирки закупоривали, их содержимое перемешивали с помощью вортекса 3 мин при частоте встряхиваний 2200 мин⁻¹, затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при частоте 3900 об/мин; по 600 мкл органической фазы дозатором переносили в пробирки типа “Эппендорф”, удаляли растворитель в токе азота

при температуре 40 °С; сухие остатки перерастворяли в 200 мкл раствора 80 % CAN — 0,35 % HCOOH. Удаление растворителя из образцов и перерастворение сухих остатков проводили с целью концентрирования проб для улучшения чувствительности методики.

Результаты и их обсуждение

Разработка аналитической методики

Установлен оптимальный диапазон концентраций для ASA (0,020–1,200 мкг/мл) и SA (0,200–12,000 мкг/мл), подобраны оптимальные условия пробоподготовки (жидкость – жидкостная экстракция этилацетатом, с последующим удалением растворителя в токе азота и перерастворением сухого остатка), хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования [2].

Валидация аналитической методики

Валидация методики проводилась на основе требований российской и международной нормативной документации в области биоаналитических методик [3, 4]. Методика валидирована по 9 параметрам: линейность калибровочных кривых; внутрисерийная правильность образцов контроля качества; внутрисерийная правильность и прецизионность; селективность; матричный эффект; степень извлечения; разведение образцов; эффект переноса предыдущей пробы; стабильности (основных и рабочих растворов аналитов и BC, краткосрочная и долгосрочная стабильность аналитов в плазме, стабильность аналитов при трехкратном замораживании — таянии).

Линейность калибровочных кривых

Проводили анализ 8 образцов плазмы (на уровнях концентраций ASA и SA, указанных в табл. 2) с добавлением раствора BC. Кроме того, анализировали бланковый образец плазмы, не содержащий растворов аналитов и BC, а также образец плазмы с добавлением раствора BC [5]. По полученным значениям были построены калибровочные графики для ASA и SA (рис. 1), которые рассчитывались по взвешенной линейной регрессии $y = -0,00141764x + 4,13411$, $R^2 = 0,9990$ — для ASA и $y = 0,0092293 + 0,534726x$, $R^2 = 0,9988$ — для SA, где x — концентрация аналита в плазме крови, y — отношение площади пика аналита к площади пика BC, R^2 — коэффициент корреляции. От-

Таблица 2

Калибровочные растворы ASA и SA

Калибровочный раствор	Концентрация ASA (мкг/мл раствора)	Концентрация SA (мкг/мл раствора)	Концентрация ASA (мкг/мл плазмы)	Концентрация SA (мкг/мл плазмы)
K1 (НПКО)	0,400	4,000	0,020	0,200
K2	0,800	8,000	0,040	0,400
K3	2,000	20,000	0,100	1,000
K4	4,000	40,000	0,200	2,000
K5	8,000	80,000	0,400	4,000
K6	16,000	160,000	0,800	8,000
K7	20,000	200,000	1,000	10,000
K8 (ВПКО)	24,000	240,000	1,200	12,000

Таблица 3

Валидационные растворы ASA и SA

Валидационный раствор	Концентрация ASA (мкг/мл раствора)	Концентрация SA (мкг/мл раствора)	Концентрация ASA (мкг/мл плазмы)	Концентрация SA (мкг/мл плазмы)
Q1 (НПКО)	0,400	4,000	0,020	0,200
Q2	1,200	12,000	0,060	0,600
Q3	2,400	24,000	0,120	1,200
Q4	9,600	96,000	0,480	4,800
Q5	19,200	192,000	0,960	9,600
Q6 (ВПКО)	24,000	240,000	1,200	12,000

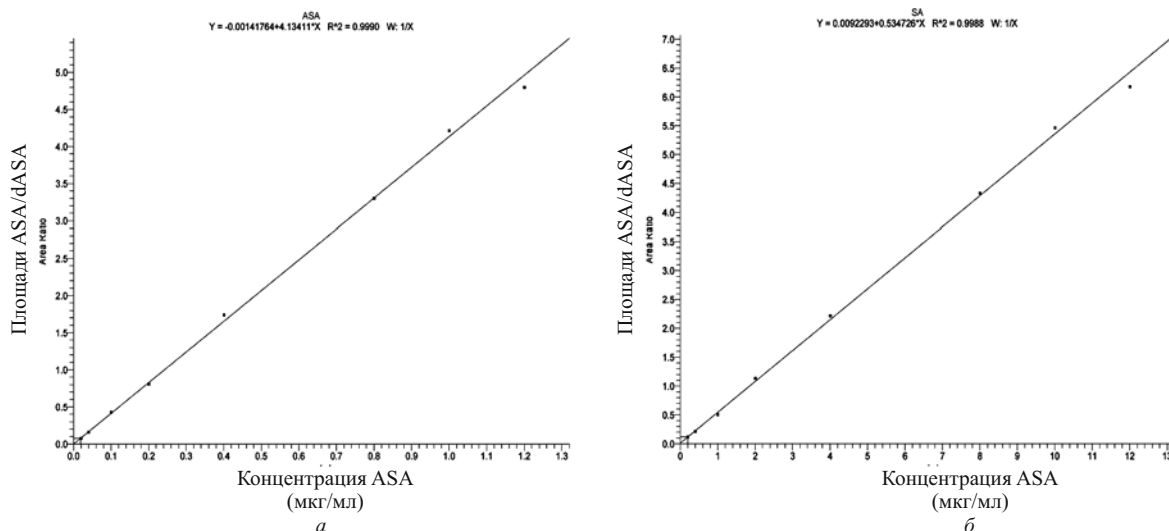


Рис. 1. Калибровочные кривые ASA (а) и SA (б).

клонения концентраций калибровочных образцов от номинальных значений приведены в табл. 4.

Внутрисерийная правильность образцов контроля качества

В ходе данного валидационного испытания были проанализированы образцы плазмы с добавленными аналитами ASA/SA в концентрациях на уровне L (нижнем), M (среднем) и H (верхнем), Q2, Q4 и Q5 соответственно, приготовленные в двух экземплярах. Соответствующая калибровочная кривая использовалась для расчета. Результаты измерений соответствуют критериям приемлемости [3] (табл. 5).

Селективность

Оценка селективности аналитической методики позволяет продемонстрировать возможную интерференцию эндогенных компонентов биологической матрицы и других компонентов образца на детектирование аналита [5]. Селективность аналитической методики определялась анализом 6 образцов бланковой плазмы (из 6 независимых источников, включая гемолизованную и гиперлипидемическую плазму) без добавления раствора аналитов и раствора ВС, а также 6 образцов плазмы (из тех же независимых источников) с добавлением раствора аналитов на уровне НПКО и

Таблица 4

Отклонения рассчитанных концентраций калибровочных образцов от их номинальных значений

Образец	Концентрация ASA номинальная (мкг/мл)	Концентрация ASA рассчитанная (мкг/мл)	Концентрация SA номинальная (мкг/мл)	Концентрация SA рассчитанная (мкг/мл)	Отклонение для ASA (%)	Отклонение для SA (%)	Максимально допустимое отклонение (%)
K1	0,020	0,019	0,200	0,204	-4,89	1,79	20,00
K2	0,040	0,040	0,400	0,388	-1,04	-3,02	15,00
K3	0,100	0,104	1,000	0,933	4,02	-6,68	15,00
K4	0,200	0,196	2,000	2,104	-2,08	5,20	15,00
K5	0,400	0,421	4,000	4,134	5,30	3,35	15,00
K6	0,800	0,800	8,000	8,088	-0,04	1,10	15,00
K7	1,000	1,020	10,000	10,210	1,98	2,10	15,00
K8	1,200	1,161	12,000	11,540	-3,26	-3,83	15,00

Таблица 5

Внутрисерийная правильность образцов контроля качества

Образец	Концентрация ASA номинальная (мкг/мл)	Концентрация ASA рассчитанная (мкг/мл)	Концентрация SA номинальная (мкг/мл)	Концентрация SA рассчитанная (мкг/мл)	Отклонение для ASA (%)	Отклонение для SA (%)	Максимально допустимое отклонение (%)
L1 (Q2)	0,060	0,063	0,600	0,676	5,28	12,70	15,00
M1 (Q4)	0,480	0,440	4,800	4,655	-8,37	-3,01	15,00
H1 (Q5)	0,960	0,907	9,600	10,018	-5,55	4,35	15,00
L2 (Q2)	0,060	0,065	0,600	0,639	8,46	6,43	15,00
M2 (Q4)	0,480	0,458	4,800	4,467	-4,64	-6,94	15,00
H2 (Q5)	0,960	0,998	9,600	9,071	3,95	-5,51	15,00

Внутрисерийная правильность и прецизионность

Образец	Концентрация ASA номинальная (мкг/мл)	Концентрация ASA рассчитанная (среднее значение) (мкг/мл)	Концентрация SA номинальная (мкг/мл)	Концентрация SA рассчитанная (среднее значение) (мкг/мл)	CV ASA (%)	CV SA (%)	Правильность ASA (%)	Правильность SA (%)
Q1	0,020	0,017	0,200	0,169	0,62	4,18	85,65	84,70
Q2	0,060	0,056	0,600	0,567	3,65	1,85	92,59	94,52
Q3	0,120	0,110	1,200	1,168	1,89	4,34	91,37	97,35
Q4	0,480	0,434	4,800	4,574	4,13	2,78	90,42	95,29
Q5	0,960	0,832	9,600	8,811	8,12	6,13	86,65	91,79
Q6	1,200	1,039	12,000	11,158	2,73	2,02	86,56	92,98

раствора ВС. Расчет концентраций ASA и SA проводили по линейной калибровочной кривой. Аналитический сигнал бланковой плазмы должен составлять не более 20,00 % отклика НПКО при времени удерживания аналита и не более 5,00 % отклика внутреннего стандарта при времени удерживания внутреннего стандарта [2]. При времени удерживания ASA аналитический сигнал бланковой плазмы не зарегистрирован. Аналитический сигнал бланковой плазмы составил 0,13, 0,18 и 0,18 % отклика внутреннего стандарта при времени удерживания внутреннего стандарта dSA в 3 из 6 образцов плазмы.

Внутрисерийная правильность и прецизионность

Готовили набор из 6 образцов контроля качества на уровнях концентрации Q1 – Q6. Выполняли определение концентрации ASA/SA. Для расчета концентраций использовалась соответствующая калибровочная кривая. Установленные критерии приемлемости: коэффициент вариации (CV) $\leq 20,00\%$ и правильность 80,00 – 120,00 % для НПКО (Q1), CV $\leq 15,00\%$ и правильность 85,00 – 115,00 % на уровне концентраций Q2 – Q6 [3]. Результаты валидационного теста представлены в табл. 6.

Матричный эффект

Изучение матричного эффекта заключается в установлении воздействия компонентов биологической матрицы (плазмы крови), содержащихся в измеряемых образцах, на отклики аналитов и ВС. Готовили 2 набора образцов бланковой плазмы из 6 независимых источников, образцы подвергали экстракции, высушивали до сухого остатка, перерастворяли и добавляли рабочий раствор аналитов на 2 уровнях концентраций (L и H) и рабочий раствор ВС. Растворы сравнения содержали аналогичные уровни аналитов и ВС в среде, не содержащей компонентов матрицы (80 % ACN — 0,35 % HCOOH). Оценивались следующие показатели: матричный фактор (MF) — отношение среднего значения площади пика в плазме к среднему значению площади пика в растворе; нормализованный матричный фактор (NMF) — частное от деления MF анализируемого вещества на MF внутреннего стандарта [3]. Значения MF для ASA и dASA меньше единицы, что указывает на подавление ионизации аналита компонентами матрицы. При оценке влияния MF на ионизацию SA и dSA отмечена тенденция близости значения к

единице, что говорит о меньшем подавлении ионизации, чем в случае ASA. Кроме того, на нижнем уровне концентрации (L) наблюдается небольшое улучшение ионизации SA. NMF не должен отличаться от единицы более чем на 15,00 %, CV для NMF не может быть больше 15,00 % [3]. Результаты теста представлены в табл. 7.

Разведение образцов

Тест на разведение образцов выполняется для возможности получения корректных результатов при исследовании образцов, в которых концентрация аналита выше, чем ВПКО, или имеющийся объем образца недостаточен (например, при повторном анализе), в таких случаях образец должен быть разведен биологической матрицей. Анализировали 6 образцов плазмы с добавлением ASA/SA с концентрацией на уровне НН (2 × Q5), которые разводили в 2 раза (1:1) бланковой плазмой и были проанализированы с использованием соответствующей калибровочной кривой. Измеренные концентрации после пересчета на фактор разведения (равный 2) переведены в номинальные (НН). Номинальные НН концентрации равны 1,920 мкг/мл для ASA и 19,200 мкг/мл для SA. Результаты теста представлены в табл. 8. Критерии приемлемости: CV $\pm 15,00\%$, правильность 85,00 – 115,00 % [3].

Степень извлечения

Степень извлечения определяли для ASA. Для оценки степени извлечения аналита и ВС используется процедура, исключаяющая влияние плазмы на обнаружение аналита и ВС. Готовили образцы на нижнем (L) и верхнем (H) уровнях концентрации аналита. Степень извлечения вычисляли как частное средних отношений площадей аналит/ВС для образцов, подвергшихся экстракции, и контрольных образцов (на степень извлечения которых плазма не оказывает влияния), выраженное в процентах. Степень извлечения ASA на нижнем и верхнем уровнях концентрации

Таблица 7

Средние значения MF и NMF

	MF ASA	MF dASA	NMF	CV NMF (%)	MF SA	MF dSA	NMF	CV NMF (%)
L	0,748	0,655	1,142	4,76	1,058	0,920	1,150	3,57
H	0,781	0,699	1,117	5,53	0,891	0,799	1,115	8,96

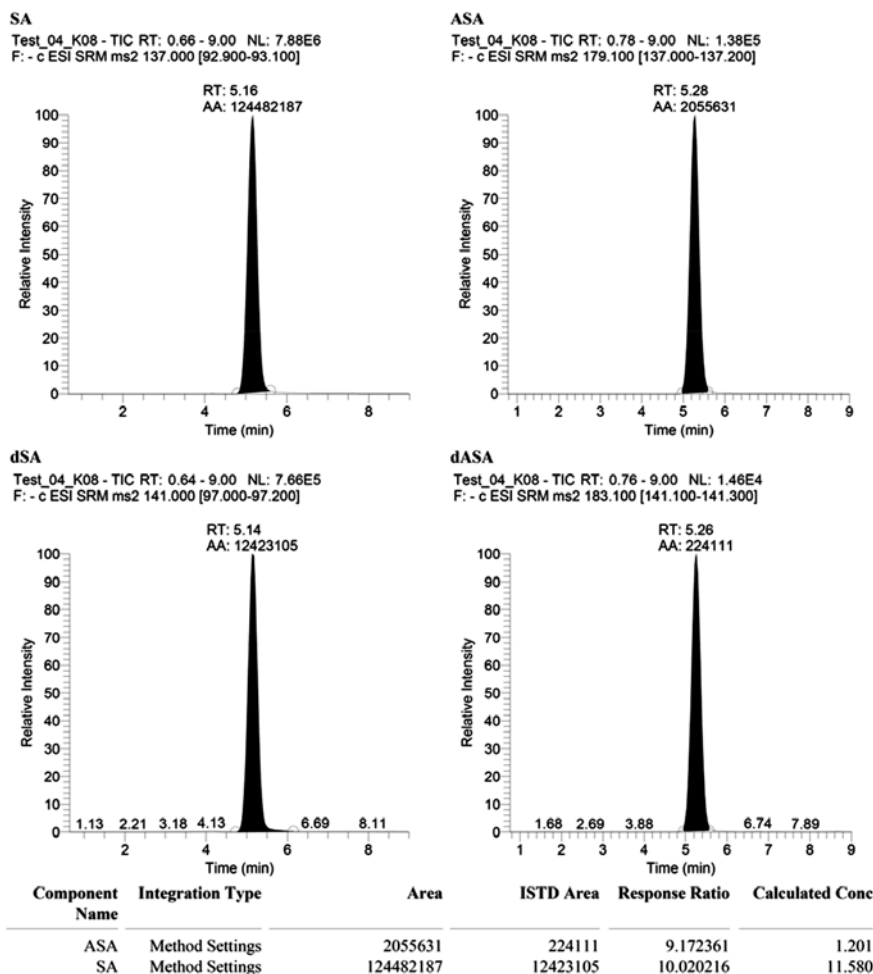


Рис. 2. Хроматограммы образца плазмы с концентрацией ASA/SA на уровне ВПКО.

составила 64,07 и 63,46 % соответственно, степень извлечения BC dASA — 70,10 %.

Эффект переноса предыдущей пробы

Тест проводился с целью оценки возможного переноса аналита от предыдущего ввода пробы к последующему. После измерения образца на уровне концентрации К8 (ВПКО), в 3 последующих бланковых образцах не обнаружены пики, соответствующие по времени удерживания пикам ASA, dASA и dSA. Следовательно, эффект переноса для ацетилсалициловой кислоты, ее BC и BC салициловой кислоты равны 0,00 %. При исследовании эффекта переноса для SA обнаружены пики в первых двух бланковых образцах, площадь которых составила 1,37 и 0,39 % от площади пика образца на уровне НПКО. Согласно критериям приемлемости, перенос из ВПКО не должен превы-

шать 20,00 % от отклика НПКО [3]. Валидационный тест одобрен. Хроматограммы образцов на уровне ВПКО представлены на рис. 2.

Оценка стабильности

Проведена оценка стабильности ASA и SA на нижнем (L) и верхнем (H) уровнях концентраций в плазме: краткосрочная (24 ч) при комнатной температуре, долгосрочная (80 дней) при температуре -20°C и в ходе трех циклов замораживания — таяния; а также определена стабильность основных и рабочих растворов аналитов на нижнем (L) и верхнем (H) уровнях концентраций и BC при хранении в холодильнике в течение 78 дней и при комнатной температуре в течение 48 ч.

Таким образом, разработана и валидирована высокочувствительная и селективная аналитическая мето-

Таблица 8

Результаты теста на разведение образцов

Показатель	Концентрация ASA рассчитанная (среднее значение) (мкг/мл)	Концентрация ASA пересчитанная (среднее значение) (мкг/мл)	Концентрация SA рассчитанная (среднее значение) (мкг/мл)	Концентрация SA пересчитанная (среднее значение) (мкг/мл)
Среднее значение	1,018	2,037	10,002	20,004
CV (%)	5,19		5,53	
Правильность (%)	106,08		104,19	

дика количественного определения ацетилсалициловой кислоты в диапазоне концентраций 0,020 – 1,200 мкг/мл и ее метаболита салициловой кислоты в диапазоне концентраций 0,200 – 12,000 мкг/мл в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Результаты валидационных тестов в установленном диапазоне концентраций соответствуют требованиям российской и международной нормативной документации в области биоаналитических методик. Данная методика может быть использована при проведении фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности препаратов ацетилсалициловой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Draft Guidance on Aspirin: Contains Nonbinding Recommendations of FDA (2017).
2. К. С. Сычев, *Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок*, Техносфера, Москва (2020), сс. 114 – 128.
3. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 85.
4. Bioanalytical Method Validation: ICH guideline M10 (2019).
5. А. Н. Миронов, *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, Т. 1, Гриф и К, Москва (2013), сс. 201 – 207.

Поступила 11.10.21

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACETYLSALICYLIC ACID AND ITS METABOLITE IN HUMAN BLOOD PLASMA BY HPLC-MS/MS

K. M. Tserkovnaya^{1*}, E. V. Flisyuk¹, and V. N. Shabrov²

¹ St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, 197376 Russia

² LLC “Quinta-Analytica Yaroslavl”, Yaroslavl, 150045 Russia

* e-mail: ksenia.kirillova@spcpu.ru

We have developed and validated new analytical method based on HPLC-MS/MS technique for the quantitative determination of acetylsalicylic acid (ASA) as antithrombotic agent and its metabolite salicylic acid (SA) in human blood plasma. The analyte concentration range was 0.020 – 1.200 mg/mL for ASA and 0.200 – 12.000 mg/mL for SA. The blood samples are processed by ethyl acetate extraction with further evaporation and re-dissolution. The main goal of this procedure is to improve the sensitivity of analysis and jointly study preparations containing both ASA and SA. Analytical system parameters are established. This methodology can be used for studying the pharmacokinetics and bioequivalence of ASA related preparations.

Keywords: acetylsalicylic acid; human blood plasma; HPLC-MS/MS; validation; bioequivalence.