

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196>  
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

## Разработка и валидация методики определения деферазирокса в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ

П. А. Карпова<sup>1,2</sup>✉, Т. Н. Комаров<sup>1</sup>, О. А. Арчакова<sup>1</sup>, Д. С. Щелгачева<sup>1</sup>,  
А. В. Суворова<sup>1</sup>, Н. С. Багаева<sup>1</sup>, П. К. Карнакова<sup>1,2</sup>, И. Е. Шохин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

<sup>2</sup> ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ Контактное лицо: Карпова Полина А. E-mail: p.karpova@cpha.ru

ORCID: П. А. Карпова – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;  
Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;  
П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 25.03.2022

Статья принята в печать: 11.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

### Резюме

**Введение.** Деферазирокс является одним из наиболее известных комплексообразующих лекарственных средств и успешно применяется в хелатирующей терапии для лечения избытка железа в организме человека. Также деферазирокс входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что свидетельствует о значимости данного лекарственного средства для российского здравоохранения. В указанном перечне присутствуют препараты только зарубежного производителя, поэтому в рамках тенденции к импортозамещению разработка препаратов деферазирокса отечественного производства является необходимым и перспективным направлением. В связи с чем возникает необходимость разработки методики, позволяющей с минимальными временными и ресурсными затратами количественно определить деферазирокс в плазме крови человека в рамках фармакокинетического исследования.

**Цель.** Целью исследования является разработка и валидация методики определения деферазирокса в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) для дальнейшего исследования фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных препаратов.

**Материалы и методы.** Определение деферазирокса в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом. Раствор эрлотиниба использовался в качестве внутреннего стандарта. Подвижная фаза: 0,3%-й раствор ортофосфорной кислоты в воде, доведенный до pH 3,0 (элюент А) и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Колонка: Symmetry®, 75 × 4,6 мм (Waters, США). Аналитический диапазон методики для деферазирокса: 0,25–70,00 мкг/мл в плазме крови. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора при длине волны поглощения 299 ± 2 нм.

**Результаты и обсуждение.** Валидация разработанной методики проводилась по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналита и внутреннего стандарта; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

**Заключение.** Была разработана и валидирована методика определения лекарственного средства деферазирокс в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Аналитический диапазон методики был подтвержден и составил 0,25–70,00 мкг/мл для деферазирокса в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения исследования фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов деферазирокса.

**Ключевые слова:** деферазирокс, плазма, железо, ВЭЖХ-УФ, валидация, определение, фармакокинетика, биоэквивалентность

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, А. В. Суворова, П. А. Карпова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. П. К. Карнакова занималась подготовкой проб к анализу. Н. С. Багаева отвечала за статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организацию исследования. Все вышеуказанные авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

**Для цитирования:** Карпова П. А., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Суворова А. В., Багаева Н. С., Карнакова П. К., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики определения деферазирокса в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(2):187–196. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196>

## Development and Validation of a Method for Determining Deferasirox in Human Blood Plasma by HPLC-UV

Polina A. Karpova<sup>1,2</sup>✉, Timofey N. Komarov<sup>1</sup>, Olga A. Archakova<sup>1</sup>,  
Dana S. Shchelgacheva<sup>1</sup>, Alexandra V. Suvorova<sup>1</sup>, Natalia S. Bagaeva<sup>1</sup>,  
Polina K. Karnakova<sup>1,2</sup>, Igor E. Shohin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ Corresponding author: Polina A. Karpova. E-mail: p.karpova@cpha.ru

© Карпова П. А., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Суворова А. В., Багаева Н. С., Карнакова П. К., Шохин И. Е., 2022

© Karpova P. A., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Suvorova A. V., Bagaeva N. S., Karnakova P. K., Shohin I. E., 2022

ORCID: Polina A. Karpova – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Shchegacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 25.03.2022 Revised: 11.05.2022 Published: 25.05.2022

## Abstract

**Introduction.** Deferasirox is one of the most well-known complexing drugs chelators and is successfully used in chelating therapy for the treatment of excess iron in the human body. Deferasirox is also included in the list of vital and essential medicines, which indicates the importance of this drug for Russian healthcare. In this document, there are drugs only from a foreign manufacturer, therefore, within the framework of the trend towards import substitution, the development of deferasirox preparations of domestic production is a necessary and promising direction. In this connection, there is a need to develop a method that allows quantifying deferasirox in human blood plasma with minimal time and resource costs as part of a pharmacokinetic study.

**Aim.** The aim of this study is to develop a method for quantitative determination of deferasirox in human blood plasma by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection (HPLC-UV) for further bioequivalence studies.

**Materials and methods.** Determination of the deferasirox in human blood plasma was carried out by HPLC-UV. The method of proteins precipitation by acetonitrile was used as a sample preparation. Erlotinib solution was used as an internal standard. Mobile phase: 0.3 % solution of orthophosphoric acid in water, brought to pH 3.0 (eluent A) and 0.1 % solution of formic acid in acetonitrile (eluent B). Column was Symmetry®, 75 × 4,6 mm (Waters, США). Analytical range of the technique for deferasirox was 0.25–70.00 µg/ml in human blood plasma. Detection was carried out using a UV detector at an absorption wavelength of 299 ± 2 nm.

**Results and discussion.** This method was validated by selectivity, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

**Conclusion.** A method of quantitative determination of deferasirox in human blood plasma was developed and validated by HPLC-UV. The analytical range was 0.25–70.00 µg/ml in human blood plasma. This method was used as part of a study of the pharmacokinetics and bioequivalence of deferasirox drugs.

**Keywords:** deferasirox, human blood plasma, iron, HPLC-UV, validation, pharmacokinetics, bioequivalence

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchegacheva, Alexandra V. Suvorova, Polina A. Karpova have developed and validated the analytical method. Polina K. Karnakova participated in sample preparation. Natalia S. Bagaeva conducted statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

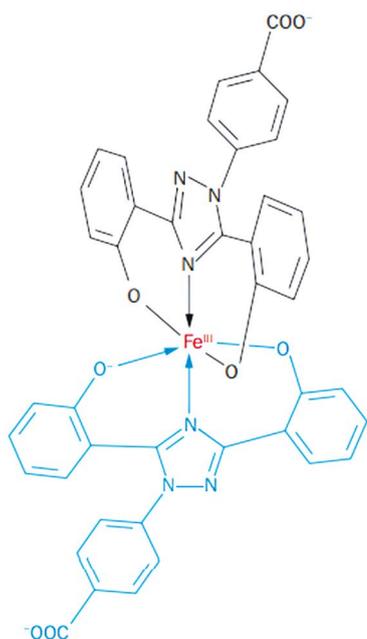
**For citation:** Karpova P. A., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchegacheva D. S., Suvorova A. V., Bagaeva N. S., Karnakova P. K., Shohin I. E. Development and validation of a method for determining deferasirox in human blood plasma by HPLC-UV. *Drug development & registration*. 2022;11(2):187–196. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196>

## ВВЕДЕНИЕ

Деферазирокс – тридентатный лиганд с высоким сродством к трехвалентному железу, при этом две молекулы лекарственного средства образуют устойчивый комплекс с одним ионом трехвалентного железа (рисунок 1) [1, 2]. Благодаря данным свойствам деферазирокс нашел применение в хелатирующей терапии для лечения β-талассемии, серповидно-клеточной анемии из-за переливания крови и других заболеваний, связанных с избытком железа в крови человека [2–4]. Механизм такой терапии основан на связывании ионов железа и образовании хелатов, которые в последствии выводятся из организма. Стоит также отметить, что деферазирокс показал антиоксидантную активность, вызывая существенное снижение скорости окислительного повреждения тканей организма человека, вызванного избытком таких эссенциальных микроэлементов, как железо и медь, которые являются катализаторами активных

форм кислорода и окислительного повреждения в биологических системах [5, 6].

Максимальная концентрация деферазирокса в плазме ( $C_{\max}$ ) и площадь под фармакокинетической кривой (AUC) зависят от дозы лекарственного средства при приеме перорально, однако время достижения  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ) не зависит от дозы и составляет около 1–2 часов. Среднее значение периода полувыведения ( $t_{1/2}$ ) деферазирокса составляет до 19 часов [2, 7]. Известно, что основным путем метаболизма деферазирокса является конъюгация с глюкуроновой кислотой: ацилглюкуронид и 2-О-глюкуронид [8]. Большая часть (около 84 %) деферазирокса и его метаболитов выводится с желчью через белок множественной лекарственной резистентности 2 [multidrug resistance protein 2 (MRP2)], а остальные 16 % выводятся через белок устойчивости к раку молочной железы [breast cancer resistance protein (BCRP)] и с мочой. Почечная экскреция в виде глюкуронида составляет всего 8 % от введенной дозы лекарственного средства [7, 9, 10].



**Рисунок 1. Структурная формула комплекса деферазирокса с железом**

**Figure 1. Chemical structure of deferasirox complex with iron**

Деферазирокс входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что свидетельствует о значимости данного лекарственного средства для российского здравоохранения. В указанном перечне присутствуют препараты только зарубежного производителя, поэтому в рамках тенденции к импортозамещению разработка препаратов деферазирокса отечественного производства является необходимым и перспективным направлением<sup>1</sup>.

В настоящее время опубликовано несколько исследований по определению деферазирокса в биологических объектах с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения данного вещества в биологических жидкостях применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)], флуориметрическим детектиро-

<sup>1</sup> Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2020 год, перечня лекарственных препаратов для медицинского применения, в том числе лекарственных препаратов для медицинского применения, назначаемых по решению врачебных комиссий медицинских организаций, перечня лекарственных препаратов, предназначенных для обеспечения лиц, больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, а также минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». (ред. от 30.03.2022). Доступно по: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_335635/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/). Ссылка активна на 28.04.2022.

ванием (ВЭЖХ-ФЛД) [high performance liquid chromatography – fluorescence detection (HPLC-FLD)] и ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography – ultraviolet detection (HPLC-UV)]. В структуре молекулы деферазирокса содержатся несколько хромофорных групп (см. рисунок 1), поэтому в большинстве рассмотренных литературных источников предпочтение отдается в пользу анализа методом ВЭЖХ-УФ.

Во многих рассмотренных методиках в качестве пробоподготовки используется способ осаждения белков ацетонитрилом (ACN) или его смесью с метанолом (MeOH) в различных соотношениях (таблица 1). Также для пробоподготовки используют такие способы как жидкость-жидкостная экстракция с возможной последующей дериватизацией для увеличения флуоресценции аналита или добавление дополнительно некоторого количества фосфатного буфера для перевода деферазирокса в свободную от железа форму, хотя подвижная фаза при таком варианте уже содержит фосфатный буфер с pH 3,0 [11, 12]. Несколько методик определения деферазирокса предполагают добавление некоторого количества этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) для того, чтобы предотвратить образование комплекса лекарственного средства с железом и определить свободную форму аналита. Также стоит отметить, что в этих методиках используется разбавление при подготовке проб для анализа [13, 14]. В других методиках рассматривают в качестве объекта исследований кровь человека или грудное молоко, а не плазму крови человека [14, 15], или время хроматографического анализа достаточно продолжительное [16].

Рассматриваемые выше методики определения деферазирокса проблематичны к реализации на практике в условиях повседневной и рутинной работы из-за трудозатратной пробоподготовки и продолжительности анализа в целом.

В данном исследовании приводится разработка и валидация методики определения деферазирокса в плазме крови человека методом ВЭЖХ с использованием ультрафиолетового детектора. В качестве пробоподготовки используется простой и доступный способ осаждения белков ацетонитрилом, а в качестве элюента А подвижной фазы – фосфатный буфер с pH 3,0, элюента В – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

Таблица 1. Методики биоаналитических исследований количественного определения деферазирокса

Table 1. Bioanalytical methods of deferasiroх quantitative determination

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Примечания по пробоподготовке Sample preparation's notes	Аналитический диапазон, мкг/мл Analytical range, µg/ml	Ссылка Reference
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение ACN с последующим добавлением фосфатного буфера и повторным центрифугированием Protein precipitation with acetonitrile followed by addition of phosphate buffer and repeated centrifugation	0,09970–19,94	[11]
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма крови человека Human blood plasma	ЖЖЭ с последующей дериватизацией дансилхлоридом Liquid-liquid extraction followed by dansyl chloride derivatization	0,02–2,00	[12]
ВЭЖХ-МС/МС LC-MS/MS	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение ACN с последующим разбавлением Protein precipitation with acetonitrile followed by dilution	0,04–40,00	[13]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Кровь человека Human blood	Дисперсная жидкость-жидкостная микроэкстракция с последующим разбавлением Dispersive liquid-liquid microextraction followed by dilution	0,20–200,00	[14]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Грудное молоко человека Human breast milk	Осаждение ACN:MeOH (70:30, по объему) с последующим упариванием и дериватизацией Protein precipitation with acetonitrile:methanol (70:30, v/v) followed by evaporation and derivatization	0,01–1,00	[15]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение ACN:MeOH (50:50, по объему) Protein precipitation by acetonitrile:methanol (50:50, v/v)	0,078125–40,00	[16]

### Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы:

- ацетонитрил (класс «for UHPLC», PanReac, Испания);
- ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «ТД «ХИММЕД», Россия);
- муравьиная кислота (класс «for analysis», PanReac, Испания);
- метанол (класс «х.ч.», ООО «ТД «ХИММЕД», Россия);
- ортофосфорная кислота (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- гидроксид натрия (класс «чистый, фармацевтическое качество», PanReac, Испания);
- вода деминерализованная (класс чистоты I).

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы субстанции деферазирокса (CTX Life Science Pvt. Ltd., Индия, содержание 100,20 %) и эрлотиниба гидрохлорида (USP reference standard, содержание 99,80 %).

Исходный стандартный раствор деферазирокса готовили путем растворения точной навески субстанции в метаноле класса «х.ч.». Рабочие стандартные растворы были приготовлены путем разведения аликвоты исходного стандартного раствора тем же растворителем в соответствии с таблицей 2.

Для приготовления рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта (BC) [internal standard (IS)] эрлотиниба точную навеску стандартного образца эрлотиниба гидрохлорида количественно переносили в мерную колбу и растворяли в ацетонитриле класса «х.ч.».

Таблица 2. Концентрации деферазирокса и ВС в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 2. Concentrations of deferasiroх and IS at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	Концентрация деферазирокса, мкг/мл Deferasiroх concentration, µg/ml	Концентрация ВС, мкг/мл IS concentration, µg/ml	Примечания Notes
1	0,25	20,00	LLOQ – нижний предел количественного определения LLOQ – lower limit of quantification
2	0,50		
3	1,00		
4	5,00		
5	10,00		L – низкий уровень концентрации L- low level of concentration
6	30,00		
7	60,00		
8	70,00		
LLOQ	0,25		M1 и M2 – средние уровни концентраций M1 and M2 – middle levels of concentration
L	0,75		
M1	21,00		
M2	42,00		
H	56,00	H – высокий уровень концентрации H – high level of concentration	

Образцы интактной плазмы, исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре от  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Пробоподготовка

К 200 мкл образца (калибровочного образца, образца контроля качества и образца интактной плазмы крови), помещенным в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 5–10 секунд, затем в течение 15 минут центрифугировали с ускорением 15 000 g. Далее супернатант переносили в хроматографические флаконы и помещали в лотки автосамплера хроматографа.

### Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Symmetry®, 75 × 4,6 мм (Waters, США).
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges Wiperex C18 4 × 3,0 мм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: 0,3%-й раствор ортофосфорной кислоты в воде, доведенный до pH 3,0 (элюент А); 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему) (элюент В).
- Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.
- Градиент состава подвижной фазы представлен на рисунке 2.
- Объем вводимой пробы: 10 мкл.
- Время удерживания деферазирокса: около 3,8 мин.
- Время удерживания эрлотиниба: около 3,2 мин.
- Время регистрации хроматограммы: 0,0–7,0 мин.
- Детектирование: УФ-детектор при длине волны поглощения  $299 \pm 2$  нм.
- Частота регистрации сигнала детектора: 5 Гц.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики

Во время разработки методики возник ряд особенностей: влияние металлов в хроматографической системе на результаты исследования, разница в определении лекарственного средства в плазме между его свободной и хелатной формами, влияние гидролиза хелата деферазирокса с железом под действием кислотных и щелочных агентов, подбор подвижной фазы и подходящего ВС. После проведения ряда экспериментов было выявлено отсутствие влияния на результат исследования системного железа из оборудования. Использование в качестве подвижной фазы 0,3%-го раствора ортофосфорной кислоты в воде, доведенного до pH 3,0, обеспечивало кислотный гидролиз хелата лекарственного средства с железом и приводило к возможности проведения определения общего деферазирокса в свободной форме. Также за счет наличия в молекуле кислотного центра в данной системе деферазирокс находился в неионизированной форме, что позволило повысить его удерживание на хроматографической колонке и получить на хроматограмме узкий и симметричный пик.

В качестве осадителя был использован ацетонитрил, так как он обеспечивал наиболее полное осаждение белков плазмы крови и оптимальную форму хроматографических пиков. Несмотря на то, что в литературных источниках приводятся другие способы пробоподготовки, выбранный способ позволил облегчить процесс и получить методику, соответствующую актуальным требованиям нормативной документации. Для определения исследуемого лекарственного средства и ВС использовался ультрафиолетовый детектор, который позволял получить пики деферазирокса и эрлотиниба за счет наличия хромофорных групп в их строении (таблица 3). В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств определяемых веществ, была выбрана хроматографическая колонка Symmetry®, 75 × 4,6 мм (Waters, США).

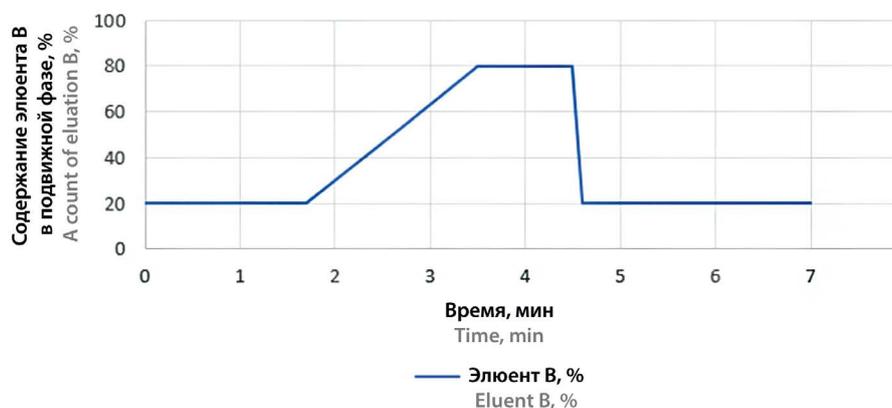
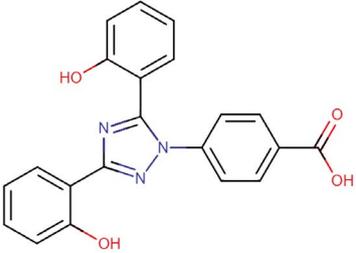
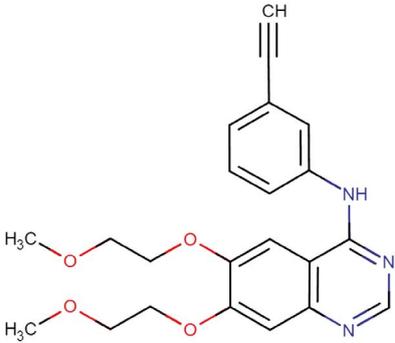


Рисунок 2. Градиент состава подвижной фазы

Figure 2. Elution's gradient

Таблица 3. Физико-химические свойства анализируемого вещества и внутреннего стандарта

Table 3. Chemical and physical characteristics of the analyte and of the IS

Наименование субстанции Name of the substance	Молекулярная масса, г/моль Molecular mass, g/mol	pKa	log P	Структурная формула Chemical formula
Деферазирокс <sup>1</sup> Deferasirox	373,3615	4,55	4,74	
Эрлотиниб <sup>2</sup> Erlotinib	393,4357	16,14	3,2	

**Примечание.** <sup>1</sup> Deferasirox. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01609>. Assessed: 24.02.2022.

<sup>2</sup> Erlotinib. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00530>. Assessed: 24.02.2022.

**Note.** <sup>1</sup> Deferasirox. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01609>. Assessed: 24.02.2022.

<sup>2</sup> Erlotinib. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00530>. Assessed: 24.02.2022.

## Валидация методики

Валидацию методики определения деферазирокса проводили в рамках исследования фармакокинетики в плазме крови человека, руководствуясь правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза<sup>1</sup>, а также руководствами FDA<sup>2</sup> и EMA<sup>3</sup> по таким параметрам, как селективность, ка-

<sup>1</sup> Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 18.03.2022.

<sup>2</sup> Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Assessed: 18.03.2022.

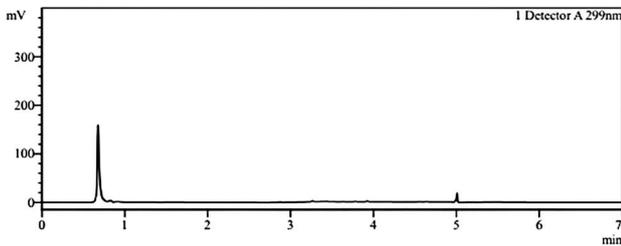
<sup>3</sup> European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Assessed: 18.03.2022.

либровочная кривая, точность и прецизионность на уровнях LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 2) внутри одного цикла и между циклами, степень извлечения, перенос пробы, нижний предел количественного определения (НПКО) и предел обнаружения, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов анализируемого вещества и ВС; краткосрочная стабильность («настолярная» и «пост-препаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке анализируемого вещества; долгосрочная стабильность аналита в матрице].

## Селективность

Для оценки данного параметра проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, 2 образца гиперлипидемической интактной плазмы и 2 образца гемолизной интактной плазмы, полученных из разных источников, а также образцов с прибавлением рабочего стандартного раствора деферазирокса № 1 и рабочего стандартного раствора ВС (см. таблицу 2).

На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков, соответствующих временам удерживания деферазирокса и эрлотиниба, не превышали 20 % от сигнала на уровне НПКО и 5 % от сигнала ВС соответственно. Хроматограмма образца интактной плазмы крови приведена на рисунке 3.



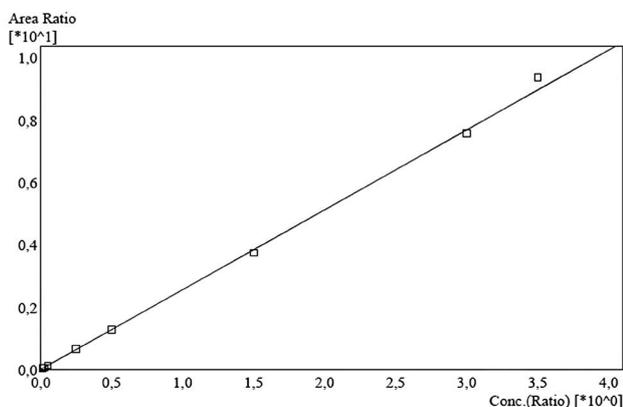
**Рисунок 3.** Хроматограмма образца интактной плазмы крови  
**Figure 3.** Blank human blood plasma sample chromatogram

### Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с добавлением рабочего стандартного раствора эрлотиниба и рабочих стандартных растворов деферазирокса для получения концентраций анализируемого вещества и ВС, соответствующих уровням 1–8 (см. таблицу 2).

По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах «отношение площади пика деферазирокса к площади пика эрлотиниба от отношения концентрации деферазирокса к концентрации эрлотиниба в плазме крови».

Калибровочные графики имели линейную зависимость (рисунок 4). Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости от номинальных значений, не превышали норму не более 20 % для 1 уровня калибровочной кривой и не более 15 % для уровней 2–8.



**Рисунок 4.** Калибровочный график  
**Figure 4.** Calibration curve

### Точность и прецизионность

Анализировали калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 2). Проводили анализ в рамках 3 последовательностей по 5 вводов образца для каждого из 5 уровней концентраций деферазирокса.

Параметр оценивали внутри цикла, между двумя и между тремя циклами. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Данные соответствовали нормам (таблица 4).

**Таблица 4.** Точность и прецизионность методики определения деферазирокса (внутри цикла, между двумя и между тремя циклами)

**Table 4.** Accuracy and precision of deferasirox determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Введено (мкг/мл) Injected (µg/ml)	RSD, %			E, %		
	Внутри цикла Inter-day (n = 5)	Между двумя циклами Intra-day 1 (n = 10)	Между тремя циклами Intra-day 2 (n = 15)	Внутри цикла Inter-day (n = 5)	Между двумя циклами Intra-day 1 (n = 10)	Между тремя циклами Intra-day 2 (n = 15)
0,25	0,74	4,60	5,05	7,53	3,19	0,98
0,75	0,26	9,42	8,06	2,17	-6,21	-4,14
21,00	0,34	2,44	3,26	3,77	1,43	3,28
42,00	0,18	0,78	1,90	-1,01	-1,72	-0,50
56,00	0,12	0,43	2,08	-0,22	-0,61	0,80

### Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной, гемолизной и гиперлипидемической плазмы без влияния степени извлечения на уровнях L, M1, M2 и H (см. таблицу 2), а также образцы контроля качества, приготовленные на различных интактных матрицах, для оценки степени извлечения. Данные представлены в таблице 5. Степень извлечения не должна быть равной 100 %, но необходимо обеспечить эффективное и воспроизводимое извлечение веществ из биологической матрицы. RSD рассчитанных значений степени извлечения анализируемого вещества из биологических матриц не превышало 15 %.

### Нижний предел количественного определения

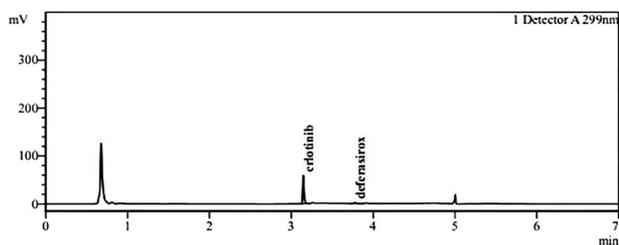
НПКО методики определяли на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. За НПКО методики принимались минимальные концентрации деферазирокса в плазме крови в соответствующих аналитических диапазонах, для которых возможно количественное определение деферазирокса со значениями RSD и E не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 0,25 мкг/мл.

**Таблица 5.** Оценка степени извлечения деферазирокса на уровнях L, M1, M2 и H из различных биологических матриц

**Table 5.** Calculation of deferasirox recovery at L, M1, M2, H levels from the different biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	СИ % Deferasirox recovery %			
	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank human blood plasma	104,07	96,15	97,86	91,90
	104,37	96,53	98,02	92,34
	104,16	96,28	97,50	91,54
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank human blood plasma	110,43	97,35	102,62	92,60
	111,17	98,07	102,46	92,74
	104,28	97,85	102,80	92,43
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank human blood plasma	104,52	101,70	100,29	97,94
	101,09	101,70	100,42	97,51
	106,04	101,41	100,03	97,32
Среднее Average	99,60			
S.D.	4,88			
RSD, %	4,90			

Хроматограмма плазмы крови с содержанием деферазирокса на уровне НПКО приведена на рисунке 5.



**Рисунок 5.** Хроматограмма плазмы крови с содержанием деферазирокса на уровне НПКО

**Figure 5.** Chromatogram of human blood plasma with deferasirox content at the level of LLOQ

### Стабильность

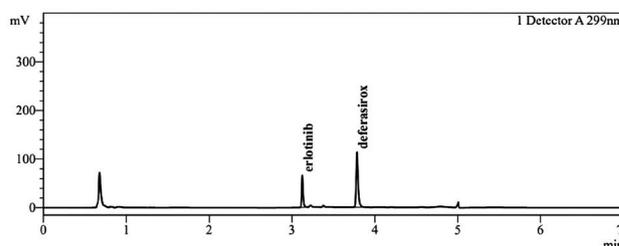
Были подтверждены на нижнем (L уровень) и верхнем (H уровень) уровнях концентраций деферазирокса следующие виды стабильности: краткосрочная стабильность («настолярная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов деферазирокса и эрлотиниба (при хранении в течение 57 дней при температуре от  $-50^{\circ}\text{C}$  до  $-35^{\circ}\text{C}$ ). Долгосрочная стабильность деферазирокса в составе плазмы крови была оценена в течение 57 дней при хранении при температуре от  $-50^{\circ}\text{C}$  до  $-35^{\circ}\text{C}$ .

### Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов с наибольшей концентрацией и образцов интактной плазмы на хроматограммах образцов интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам деферазирокса и ВС.

### Применение разработанной методики

На основе разработанной методики был проведен аналитический этап исследования фармакокинетики и биоэквивалентности препарата отечественного производства в виде капсул 360 мг и препарата сравнения Джадену®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 360 мг (Novartis Pharma AG, Швейцария). На рисунке 6 приведен пример хроматограммы образца плазмы крови добровольца, принимавшего участие в данном исследовании.



**Рисунок 6.** Хроматограмма плазмы крови добровольца

**Figure 6.** Chromatogram of volunteer human blood plasma sample

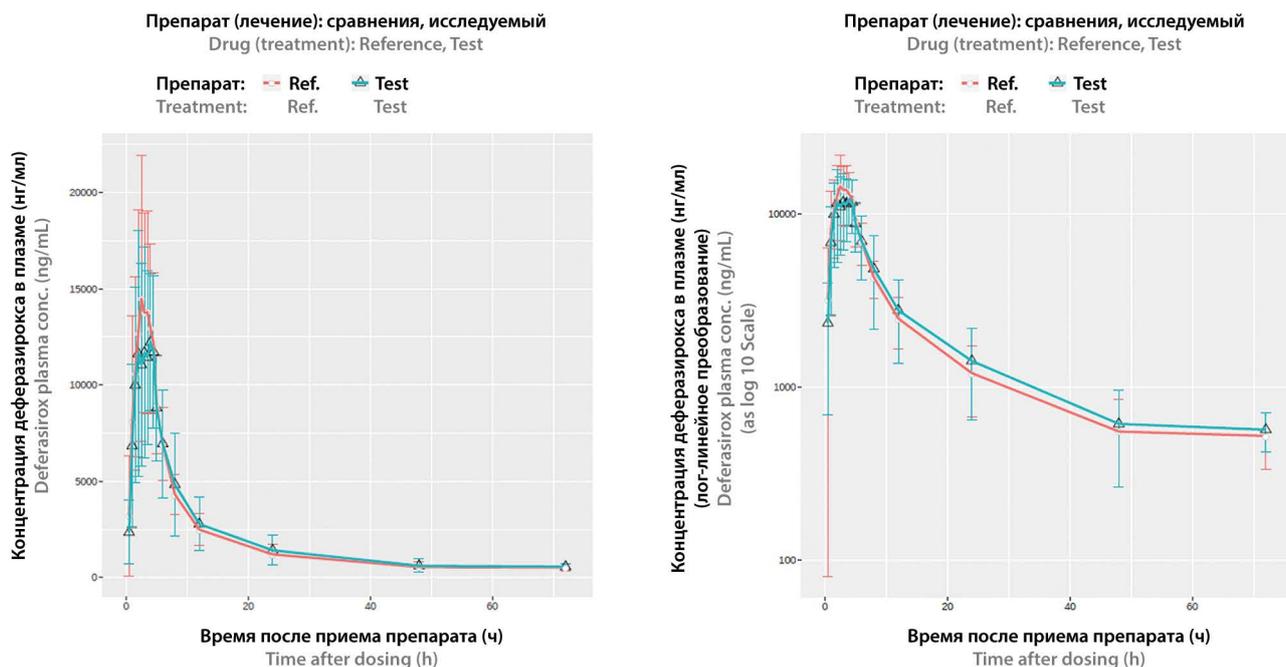
Индивидуальные профили изменения значений концентраций деферазирокса в плазме крови человека во времени ( $t$ ), зарегистрированные после приема исследуемого препарата и препарата сравнения, характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества, площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного средства до последней определяемой концентрации во временной точке  $t$ , выше НПКО ( $AUC_{0-t}$ ), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного средства до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ ).

В таблице 6 приведены значения средних арифметических и средних геометрических для фармакокинетических параметров  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$  препаратов исследования.

Фармакокинетические профили исследуемого препарата отечественного производства и препарата сравнения Джадену® приведены на рисунке 7.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения деферазирокса в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденный



**Рисунок 7.** Усредненные фармакокинетические профили деферазирокса (в линейном и лог-линейном преобразовании, со стандартными отклонениями). Исследуемый препарат (Test), препарат сравнения (Ref)

**Figure 7.** Average pharmacokinetic profiles of deferasirox (in linear and log-linear scales, with standard deviations). Test drug (Test), Reference drug (Ref)

аналитический диапазон методики составил 0,25–70,00 мкг/мл в плазме крови, что позволяет применять разработанную методику для аналитической части исследований фармакокинетики лекарственных средств деферазирокса. Данная методика была успешно применена в рамках проведения исследования фармакокинетики и биоэквивалентности препарата отечественного производства, действующим веществом которого является деферазирокс, в сравнении с препаратом Джадену®.

**Таблица 6.** Значения средних арифметических и средних геометрических для фармакокинетических параметров  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$  препаратов исследования

**Table 6.** Arithmetic means and geometric means values of pharmacokinetic parameters  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  and  $AUC_{0-\infty}$  of drugs

Параметры Parameters	Mean (GMean)	
	Test	Ref
$C_{max}$ , нг/мл $C_{max}$ , ng/ml	15470,69 (14835,09)	17007,17 (16156,61)
$AUC_{0-t}$ , нг · ч/мл $AUC_{0-t}$ , ng · hr/ml	126573,68 (117373,66)	122832,27 (116930,07)
$AUC_{0-\infty}$ , нг · ч/мл $AUC_{0-\infty}$ , ng · hr/ml	138394,34 (128355,91)	134336,92 (127641,14)

**Примечание.** Значения приведены в формате Mean (GMean), где Mean – среднее арифметическое; GMean – среднее геометрическое. Исследуемый препарат (Test), препарат сравнения (Ref).

**Note.** The values are presented as Mean (GMean) format; Mean is arithmetic mean; GMean is geometric mean. Test drug (Test), Reference drug (Ref).

## ЛИТЕРАТУРА

- Díaz-García J. D., Gallegos-Villalobos A., Gonzalez-Espinoza L., Sanchez-Niño M. D., Villarrubia J., Ortiz A. Deferasirox Nephrotoxicity – the Knowns and Unknowns. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(10):574–586. DOI: 10.1038/nrneph.2014.121.
- Yang L. P. H., Keam S. J., Keating G. M. Deferasirox. A Review of its Use in the Management of Transfusional Chronic Iron Overload. *Drugs*. 2007;67(15): 2211–2230. DOI: 10.2165/00003495-200767150-00007.
- Бабаева Т. Н., Поспелова Т. И., Нечунаева И. Н. Формирование избытка железа у пациентов с миелодиспластическим синдромом в группах промежуточного и низкого риска. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(1):77–83. DOI: 10.15372/SSMJ20190111.
- Bollig C., Schell L. K., Rucker G., Allert R., Motschall E., Niemeyer C. M., Bassler D., Meerpohl J. J. Deferasirox for Managing Iron Overload in People with Thalassaemia. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2017;8(8):CD007476. DOI: 10.1002/14651858.CD007476.pub3.
- Timoshnikov V. A., Kichigina L. A., Selyutina O. Y., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant Activity of Deferasirox and its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone. *Molecules*. 2021;26(16):5064. DOI: 10.3390/molecules26165064.
- Kang H., Han M., Xue J., Baek Y., Chang J. O., Hu S., Nam H., Jo M. J., Fakhri G. E., Hutchens M. P., Choi H. S., Kim J. Renal Clearable Nano-chelators for Iron Overload Therapy. *Nature Communications*. 2019;10(1):1–11. DOI: 10.1038/s41467-019-13143-z.
- Piolatto A., Berchiolla P., Allegra S., De Francia S., Ferrero G. B., Piga A. Pharmacological and Clinical Evaluation of Deferasirox Formulations for Treatment Tailoring. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-021-91983-w.
- Waldmeier F., Bruin G. J., Glaenzel U., Hazell K., Sechaud R., Warrington S., Porter J. B. Pharmacokinetics, Metabolism and Disposition of Deferasirox in  $\beta$ -thalassemic Patients with Transfusion-de-

- pendent Iron Overload who are at Pharmacokinetic Steady State. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(5):808–816. DOI: 10.1124/dmd.109.030833.
- Tanaka C. Clinical Pharmacology of Deferasirox. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(8):679–694. DOI: 10.1007/s40262-014-0151-4.
  - Chen J., Xu Y., Lou H., Jiang B., Shao R., Yang D., Hu Y., Ruan Z. Effect of Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Deferasirox in Healthy Chinese Subjects and an Artificial Neural Networks Model for Pharmacokinetic Prediction. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):761–770. DOI: 10.1007/s13318-020-00647-z.
  - Paramanindita A. S., Harahap Y., Wijayanti T. R., Lusthom W., Prasaja B., Widjaja E., Sandra M., Puspanegara G. Efficacy of Deferasirox Through Bioequivalence Study in Indonesian Healthy Volunteer. *Iranian Journal of Blood and Cancer*. 2021;13(2):48–53.
  - Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. Liquid Chromatographic Analysis for the Determination of Deferasirox in Pharmaceutical Formulations and Spiked Plasma Samples Using Dansyl Chloride Reagent. *Journal of Chemical Metrology*. 2020;14(1):35–41. DOI: 10.25135/jcm.35.20.01.1518.
  - Li T., Cui Z., Wang Y., Yang W., Li D., Song Q., Sun L., Ding L. A Simple LC–MS/MS Method for Determination of Deferasirox in Human Plasma: Troubleshooting of Interference from Ferric Ion in Method Development and its Application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;151:145–150. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.052.
  - Golpayegani M. R., Akramipour R., Fattahi N. Sensitive Determination of Deferasirox in Blood of Patients with Thalassemia Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Followed by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113735. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113735.
  - Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. A Liquid Chromatographic Analysis of Deferasirox in Human Breast Milk with Fluorimetric Detection. *Chromatographia*. 2020;83(11):1329–1333. DOI: 10.1007/s10337-020-03953-5.
  - De Francia S., Massano D., Piccione F. M., Pirro E., Racca S., Di Carlo F., Piga A. A New HPLC UV Validated Method for Therapeutic Monitoring of Deferasirox in Thalassaemic Patients. *Journal of Chromatography B*. 2012;893-894:127–133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.047.
  - Piolatto A., Berchiolla P., Allegra S., De Francia S., Ferrero G. B., Piga A. Pharmacological and Clinical Evaluation of Deferasirox Formulations for Treatment Tailoring. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-021-91983-w.
  - Waldmeier F., Bruin G. J., Glaenzel U., Hazell K., Sechaud R., Warrington S., Porter J. B. Pharmacokinetics, Metabolism and Disposition of Deferasirox in  $\beta$ -thalassemic Patients with Transfusion-dependent Iron Overload who are at Pharmacokinetic Steady State. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(5):808–816. DOI: 10.1124/dmd.109.030833.
  - Tanaka C. Clinical Pharmacology of Deferasirox. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(8):679–694. DOI: 10.1007/s40262-014-0151-4.
  - Chen J., Xu Y., Lou H., Jiang B., Shao R., Yang D., Hu Y., Ruan Z. Effect of Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Deferasirox in Healthy Chinese Subjects and an Artificial Neural Networks Model for Pharmacokinetic Prediction. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):761–770. DOI: 10.1007/s13318-020-00647-z.
  - Paramanindita A. S., Harahap Y., Wijayanti T. R., Lusthom W., Prasaja B., Widjaja E., Sandra M., Puspanegara G. Efficacy of Deferasirox Through Bioequivalence Study in Indonesian Healthy Volunteer. *Iranian Journal of Blood and Cancer*. 2021;13(2):48–53.
  - Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. Liquid Chromatographic Analysis for the Determination of Deferasirox in Pharmaceutical Formulations and Spiked Plasma Samples Using Dansyl Chloride Reagent. *Journal of Chemical Metrology*. 2020;14(1):35–41. DOI: 10.25135/jcm.35.20.01.1518.
  - Li T., Cui Z., Wang Y., Yang W., Li D., Song Q., Sun L., Ding L. A Simple LC–MS/MS Method for Determination of Deferasirox in Human Plasma: Troubleshooting of Interference from Ferric Ion in Method Development and its Application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;151:145–150. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.052.
  - Golpayegani M. R., Akramipour R., Fattahi N. Sensitive Determination of Deferasirox in Blood of Patients with Thalassemia Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Followed by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113735. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113735.
  - Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. A Liquid Chromatographic Analysis of Deferasirox in Human Breast Milk with Fluorimetric Detection. *Chromatographia*. 2020;83(11):1329–1333. DOI: 10.1007/s10337-020-03953-5.
  - De Francia S., Massano D., Piccione F. M., Pirro E., Racca S., Di Carlo F., Piga A. A New HPLC UV Validated Method for Therapeutic Monitoring of Deferasirox in Thalassaemic Patients. *Journal of Chromatography B*. 2012;893-894:127–133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.047.

## REFERENCES

- Díaz-García J. D., Gallegos-Villalobos A., Gonzalez-Espinoza L., Sanchez-Niño M. D., Villarrubia J., Ortiz A. Deferasirox Nephrotoxicity – the Knowns and Unknowns. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(10):574–586. DOI: 10.1038/nrneph.2014.121.
- Yang L. P. H., Keam S. J., Keating G. M. Deferasirox. A Review of its Use in the Management of Transfusional Chronic Iron Overload. *Drugs*. 2007;67(15): 2211–2230. DOI: 10.2165/00003495-200767150-00007.
- Babaeva T. N., Pospelova T. I., Nechunaeva I. N. Formation of iron excess in patients with intermediate and lower-risk myelodysplastic syndrome. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(1):77–83. (In Russ.) DOI: 10.15372/SSMJ20190111.
- Bollig C., Schell L. K., Rücker G., Allert R., Motschall E., Niemeyer C. M., Bassler D., Meerpohl J. J. Deferasirox for Managing Iron Overload in People with Thalassaemia. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2017;8(8):CD007476. DOI: 10.1002/14651858.CD007476.pub3.
- Timoshnikov V. A., Kichigina L. A., Selyutina O. Y., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant Activity of Deferasirox and its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone. *Molecules*. 2021;26(16):5064. DOI: 10.3390/molecules26165064.
- Kang H., Han M., Xue, J., Baek Y., Chang J. O., Hu S., Nam H., Jo M. J., Fakhri G. E., Hutchens M. P., Choi H. S., Kim J. Renal Clearable Nano-chelators for Iron Overload Therapy. *Nature Communications*. 2019;10(1):1–11. DOI: 10.1038/s41467-019-13143-z.