

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139>
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ

Т. Н. Комаров^{1*}, И. Е. Шохин¹, О. А. Мискив¹, Д. С. Богданова¹, А. В. Алешина¹,
Ю. В. Медведев^{1,2}, Н. С. Багаева^{1*}

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 06.04.2020. Статья принята к печати: 15.05.2020

Резюме

Введение. Вирусные инфекции являются серьезной проблемой, возникающей в процессе применения иммунодепрессантов в ходе подготовки к трансплантации органов и в послеоперационном периоде. Цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция – одна из основных причин заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом. Она оказывает непосредственное влияние на отторжение трансплантатов. Кроме того, ЦМВ часто является причиной других иммунных осложнений. Для лечения и профилактики данного инфекционного заболевания используют противовирусные лекарственные препараты. Валганцикловир является пролекарством, активным метаболитом которого является ганцикловир. Валганцикловир является препаратом выбора при лечении ЦМВ-инфекций. В настоящее время нет опубликованных методик о совместном определении валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. В данной работе приведена разработка и валидация методики совместного определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови после пробоподготовки способом осаждения белков.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения валганцикловира и его активного метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови проводили методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая (линейность), точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения валганцикловира и его активного метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,0–1000,0 нг/мл для валганцикловира и 100,0–10000,0 нг/мл для ганцикловира в плазме крови. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих валганцикловир.

Ключевые слова: валганцикловир, ганцикловир, плазма, ВЭЖХ-УФ, количественное определение, валидация, биоэквивалентность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, Д. С. Богданова, О. А. Мискив, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку полученных результатов. И. Е. Шохин и Ю. В. Медведев отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(2): 133–139.

Development and Validation of Valganciclovir and its Active Metabolite Ganciclovir Determination in Human Plasma by HPLC-UV Method

Timofey N. Komarov^{1*}, Igor E. Shohin¹, Olga A. Miskiv¹, Dana S. Bogdanova¹,
Alexandra V. Aleshina¹, Yuri V. Medvedev^{1,2}, Natalia S. Bagaeva¹

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
2 – 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: Timofey N. Komarov. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Received: 06.04.2020. Accepted: 15.05.2020

Abstract

Introduction. Viral infections are a serious problem that occurs during the use of immunosuppressants in preparation for organ transplantation and in the postoperative period. Cytomegalovirus (CMV) infection is one of the main causes of diseases in people with weakened immune systems. It has a direct impact on one's body and makes it more likely to reject a transplanted organ. Antiviral drugs are used to treat and prevent this infectious

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., 2020

© Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S., 2020

disease. Valganciclovir is a prodrug whose active metabolite is ganciclovir. Valganciclovir is the drug of choice in the treatment of CMV infections. Currently, there are no researches on the matter of simultaneous determination of both valganciclovir and ganciclovir in human blood plasma by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection. This research delivers a thorough description of development and validation of a particular method for simultaneous determination of valganciclovir and ganciclovir in the plasma after sample preparation by the method of protein precipitation.

Aim. The aim of this study is to develop method for the quantitative determination of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir in human plasma by HPLC-UV for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Quantitative determination of valganciclovir in plasma by HPLC-UV. A sample was prepared using protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next validation parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, carry-over and stability.

Conclusion. The method of the quantitative determination of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir in human plasma was developed and validated by HPLC-UV. The analytical range of the was 5,0–1000,0 ng/ml for valganciclovir and 100,0–10000,0 ng/ml for ganciclovir in plasma. Method could be applied to determination of valganciclovir and ganciclovir in plasma for PK and BE studies.

Keywords: valganciclovir, ganciclovir, plasma, HPLC-UV, quantitative determination, validation, bioequivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv, Alexandra V. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin and Yuri V. Medvedev 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: Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and validation of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir determination in human plasma by HPLC-UV method. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 133–139.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции являются серьезной проблемой, возникающей в процессе применения иммунодепрессантов в ходе подготовки к трансплантации органов и в послеоперационном периоде [1]. Цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция – одна из основных причин заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом [1, 2]. Она оказывает непосредственное влияние на отторжение трансплантатов. Для лечения и профилактики данного инфекционного заболевания используют противовирусные лекарственные препараты [3].

Ганцикловир – противовирусный препарат, синтетический аналог 2'-дезоксигуанозина, который конвертируется в клетках организма человека с помощью фермента фосфотрансферазы в ганцикловир монофосфат, модифицируется далее рядом других фосфориллов. В итоге в виде ганцикловира трифосфата под действием вирусных ДНК-полимераз встраивается в растущую вирусную ДНК, приводя к нарушению ее удлинения и прекращению репликации возбудителя. Так как фосфорилирование ганцикловира в большей степени зависит от действия вирусных киназ, чем от ферментов клеток человека, оно происходит преимущественно в инфицированных герпес-вирусами клетках [4].

Долгое время ганцикловир являлся препаратом выбора для медикаментозного лечения ЦМВ-инфекций. Внутривенное введение в течение длительного времени являлось золотым стандартом лечения данной инфекции, однако это связано с риском развития других инфекций [5]. Пероральный ганцикловир несмотря на свою безопасность и удобство в применении обладает низкой биодоступностью (около 6%), поэтому он недостаточно эффективен при ЦМВ-инфекциях [5, 6].

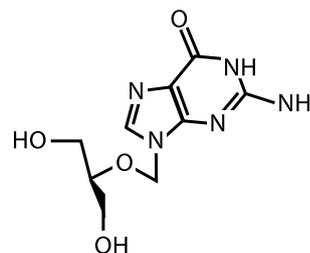


Рисунок 1. Структурная формула ганцикловира

Figure 1. The structural formula of ganciclovir

Валганцикловир – L-валиловый эфир ганцикловира – является пролекарством. Он всасывается через кишечник с помощью пептидных транспортеров PEPT1 и PEPT2 [2]. После всасывания происходит трансформация валганцикловира с ганцикловир под действием кишечных и печеночных эстераз [2, 4]. Биодоступность валганцикловира при пероральном приеме в 10 раз выше по сравнению с ганцикловиром [6], что позволяет использовать более удобную пероральную форму валганцикловира вместо внутривенной формы ганцикловира, сохраняя стабильные концент-

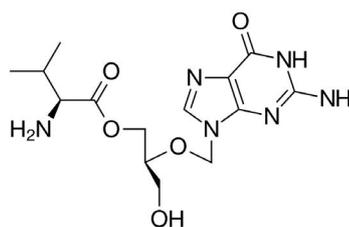


Рисунок 2. Структурная формула валганцикловира

Figure 2. The structural formula of valganciclovir

рации лекарственного средства в крови для длительной поддерживающей терапии [4].

В литературных данных представлено большое количество методик определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектором (ВЭЖХ-ФЛД) в сочетании с пробоподготовкой способом осаждения водным раствором трихлоруксусной кислоты (ТСА/Н₂О) [3, 7, 8], высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) в сочетании с пробоподготовкой способом осаждения ТСА/Н₂О [1, 5] и способом осаждения ацетонитрилом [9], а также высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС) в сочетании с пробоподготовкой твердофазной экстракцией (ТФЭ) [6] и способом осаждения метанолом [10].

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения ганцикловира и валганцикловира

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of ganciclovir and valganciclovir

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
<i>Ганцикловир</i>			
ВЭЖХ-УФ	6 % ТСА/Н ₂ О	63,0–2080,0	[1]
ВЭЖХ-ФЛД	15 % ТСА/Н ₂ О	100,0–10000,0	[3]
ВЭЖХ-УФ	50 % ТСА/Н ₂ О	500,0–30000,0	[5]
ВЭЖХ-ФЛД	15 % ТСА/Н ₂ О	40,0–4000,0	[7]
ВЭЖХ-ФЛД	7 % ТСА/Н ₂ О	20,0–2000,0	[8]
<i>Валганцикловир</i>			
ВЭЖХ-УФ	Ацетонитрил	10,0–30000,0	[9]
<i>Валганцикловир и ганцикловир</i>			
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	5,0–800,0 и 70,0–11200,0 соотв.	[6]
ВЭЖХ-МС/МС	Метанол	4,0–512,0 и 100,0–12800,0 соотв.	[10]

Как показал анализ литературы, в настоящее время нет опубликованных данных по совместному определению валганцикловира и его активного метаболита ганцикловира в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ для исследований фармакокинетики.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения 50 % трифторуксусной кислотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100, оснащённом градиентным

насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, флуориметрическим и фотодиодноматричным детекторами. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation, OpenLAB (США).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (UHPLC grade, Panreac), метанол (supergradient grade, J.T. Baker), кислота уксусная ледяная (х.ч., ООО «НИК Алинда»), аммония ацетат (ос.ч., ООО «Компания Хеликон»), кислота трифторуксусная (х.ч., ООО «ПраймКемикалсГрупп»), вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы валганцикловира (Sun Pharmaceutical Industries Ltd., содержание 100,6%), ганцикловира гидрохлорида (Sigma-Aldrich, содержание 98,8%) и ацикловира (USP reference standard).

Исходные стандартные растворы валганцикловира, ганцикловира и внутреннего стандарта (ВС) ацикловира готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходный раствор, стандартный раствор и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 600 мкл калибровочного образца (либо к 600 мкл образца плазмы крови добровольцев), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта ацикловира, затем прибавляли 300 мкл 50 % водного раствора трифторуксусной кислоты, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

Уровень	Концентрация аналита, нг/мл		Концентрация внутреннего стандарта, мл
	валганцикловир	ганцикловир	ацикловир
1	5,0	100,0	1666,0
2	10,0	250,0	1666,0
3	50,0	500,0	1666,0
4	100,0	1000,0	1666,0
5	250,0	2500,0	1666,0
6	500,0	5000,0	1666,0
7	1000,0	10000,0	1666,0

Условия хроматографического разделения и детектирования

- ✓ Колонка: YMC-Pack Polyamine II, 250 x 4,6 мм, S – 5 мкм, 12 нм.
- ✓ Температура термостата: 50 °С.
- ✓ Подвижная фаза: элюент А – 50 мМ ацетатный буфер с рН 5,0 (по объёму); элюент В – 0,1 % раствор уксусной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- ✓ Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	8,00	92,00	2,00
13,00	8,00	92,00	
13,10	12,00	88,00	
20,50	12,00	88,00	
20,60	80,00	20,00	
23,00	80,00	20,00	
23,10	8,00	92,00	
26,00	8,00	92,00	

- ✓ Объем вводимой пробы: 20 мкл.
- ✓ Время регистрации хроматограммы: 0–26 мин.
- ✓ Время удерживания валганцикловира: около 10,9 мин.
- ✓ Время удерживания ацикловира: около 13,6 мин.
- ✓ Время удерживания ганцикловира: около 21,5 мин.
- ✓ Параметры УФ-детектора: длина волны поглощения 254 нм, частота регистрации: 1 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики было отмечено слабое удерживание исследуемых веществ на колонках с октадецилсиликагелевым сорбентом, совпадающее с удерживанием ряда компонентов плазмы, регистрирующихся на хроматограмме как в виде отдельных пиков, так и в виде фронта. В случае применения масс-селективного детектирования достаточное разделение валганцикловира и ганцикловира с компонентами плазмы достигается за счёт высокой селективности детектора. При использовании УФ-детектора возникает необходимость подбора неподвижной фазы, в достаточной мере обеспечивающей удерживание разделяемых компонентов. Поскольку валганцикловир, ганцикловир и внутренний стандарт ацикловир по своей структуре являются азотистыми основаниями, наиболее приемлемых результатов удалось добиться при использовании хроматографической колонки с аминсорбентом YMC-Pack Polyamine II при использовании обратного градиента.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств, том I [11]; а также руководств FDA [12] и EMA [13] по следующим параметрам:

- селективность;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность (стабильность исходных и рабочих растворов аналита и ВС; стабильность замороженного и размороженного аналита; краткосрочная стабильность аналита в матрице; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, и образца интактной плазмы крови с прибавлением смешанного рабочего стандартного раствора валганцикловира и ганцикловира до концентрации, соответствующей уровню № 7, а также рабочего раствора внутреннего стандарта (ацикловира). На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующих временам удерживания валганцикловира и ганцикловира. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 3 и 4.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 7 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора внутреннего стандарта ацикловира и смешанных рабочих стандартных растворов валганцикловира и ганцикловира до концентраций, указанных в таблице 2. По полученным значениям были построены калибровочные графики, приведенные на рисунках 5 и 6, совместно с уравнением калибровочной кривой.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений приведены в таблице 4.

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням №№ 1, 2, 6 и 7, указанных в таблице № 2. Анализ валидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизи-

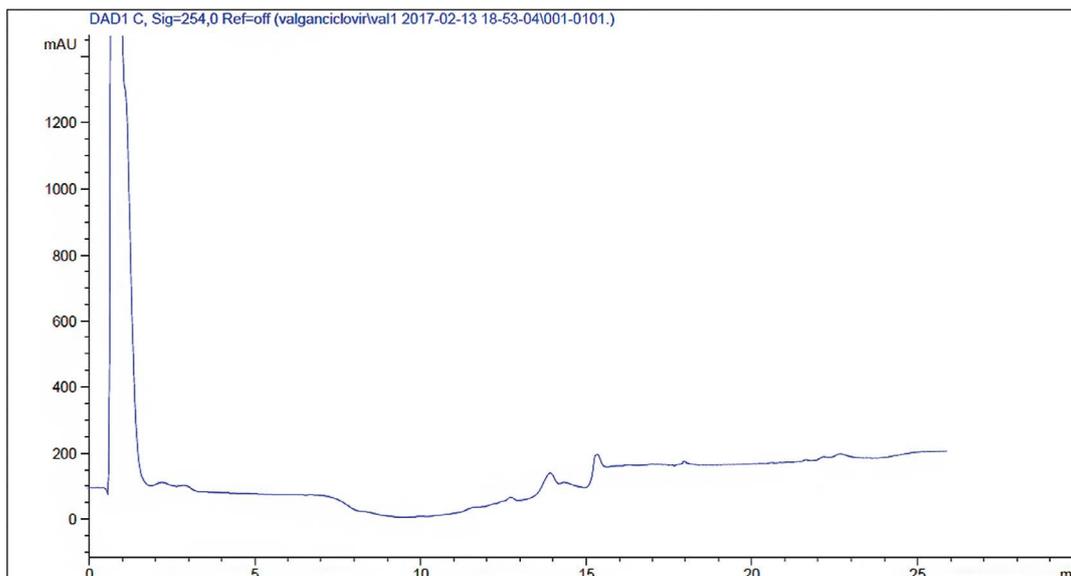


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample

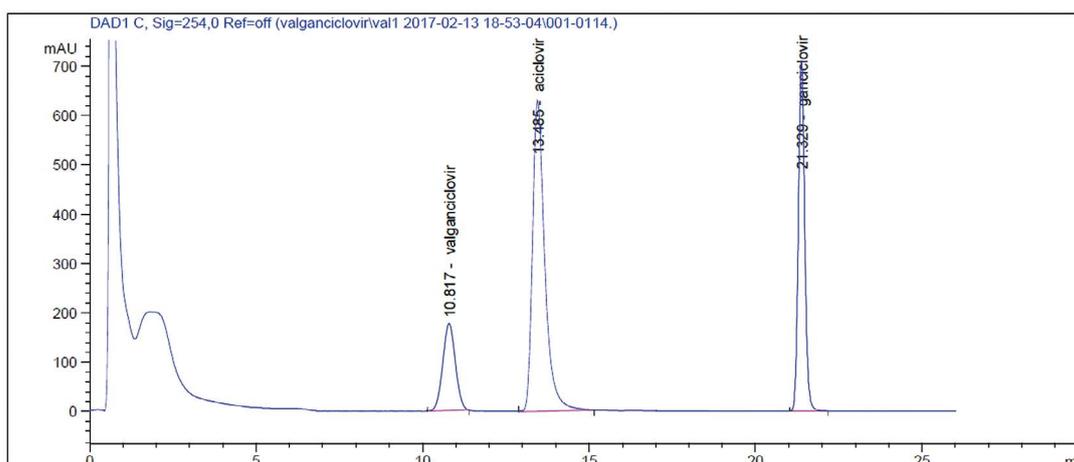


Рисунок 4. Хроматограмма калибровочного образца плазмы крови, уровень № 7 (таблица 2)

Figure 4. Chromatogram of calibration sample, level № 7 (table 2)

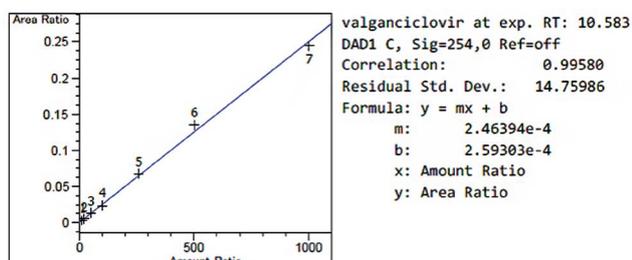


Рисунок 5. Калибровочный график зависимости отношения площади пика валганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации валганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови

Figure 5. The calibration curve dependence of the ratio area peak of valganciclovir to the aciclovir on the concentration ratio of valganciclovir to the fciclovir in plasma

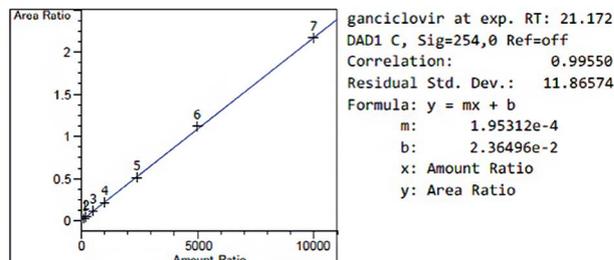


Рисунок 6. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации ганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови

Figure 6. The calibration curve dependence of the ratio area peak of ganciclovir to the aciclovir on the concentration ratio of ganciclovir to the fciclovir in plasma

онность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблице 5.

Таблица 4. Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график № 1

Table 4. Deviations of analyte concentrations in calibration samples from their nominal values, calibration curve № 1

Концентрация валганцикловира номинальная, нг/мл	Концентрация валганцикловира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %
5,0	4,9	-1,8	20
10,0	11,0	10,1	15
50,0	52,3	4,7	15
100,0	98,3	-1,7	15
250,0	261,1	4,5	15
500,0	480,9	-3,8	15
1000,0	923,4	-7,7	15
Концентрация ганцикловира номинальная, нг/мл	Концентрация ганцикловира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %
100,0	112,1	12,1	100,0
250,0	241,2	-3,5	250,0
500,0	515,6	3,1	500,0
1000,0	1065,3	6,5	1000,0
2500,0	2601,4	4,1	2500,0
5000,0	4852,4	-3,0	5000,0
10000,0	11023,1	10,2	10000,0

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принимались минимальные концентрации валганцикловира и ганцикловира в плазме крови в диапазонах линейной зависимости, для которых возможно количественное определение валганцикловира и ганцикловира со значениями RSD и E не более 20 %.

Нижний предел количественного определения методики составил 5,0 нг/мл для валганцикловира и 100,0 нг/мл для ганцикловира. Хроматограмма плазмы крови с содержанием валганцикловира и ганцикловира на уровне НПКО приведена на рисунке 7. Отношение сигнал/шум по пикам валганцикловира и ганцикловира на уровне НПКО не превышает 10,4. Предел обнаружения валганцикловира и ганцикловира для данной методики составил около 3,9 нг/мл и 45,3 нг/мл соответственно.

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 30 дней при температуре -45 °C), долгосрочная стабильность (при хранении

Таблица 5. Точность и прецизионность методики

Table 5. Accuracy and precision of the method

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение			SD			RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
<i>Валганцикловир</i>												
5,0	5,1	5,1	5,1	0,1	0,2	0,4	1,8	4,3	7,0	1,6	2,5	2,9
10,0	10,8	11,2	10,9	1,2	1,2	0,8	11,3	10,9	7,4	7,8	11,7	8,8
500,0	496,7	506,7	501,0	35,9	32,8	24,8	7,2	6,5	5,0	-0,7	1,3	0,2
1000,0	1013,5	1008,1	1000,9	58,8	72,8	91,0	5,8	7,2	9,1	1,4	0,8	0,1
<i>Ганцикловир</i>												
100,0	101,8	99,8	99,0	8,2	7,7	3,0	8,0	7,7	3,1	1,8	-0,7	-1,0
250,0	246,6	245,6	244,9	8,6	7,0	8,1	3,5	2,8	3,3	-1,4	-1,8	-2,0
5000,0	5073,7	5031,5	5047,2	258,4	222,3	105,6	5,1	4,4	2,1	1,5	0,6	0,9
10000,0	10166,5	10019,9	10057,0	441,5	582,6	314,5	4,3	5,8	3,1	1,7	0,2	0,6

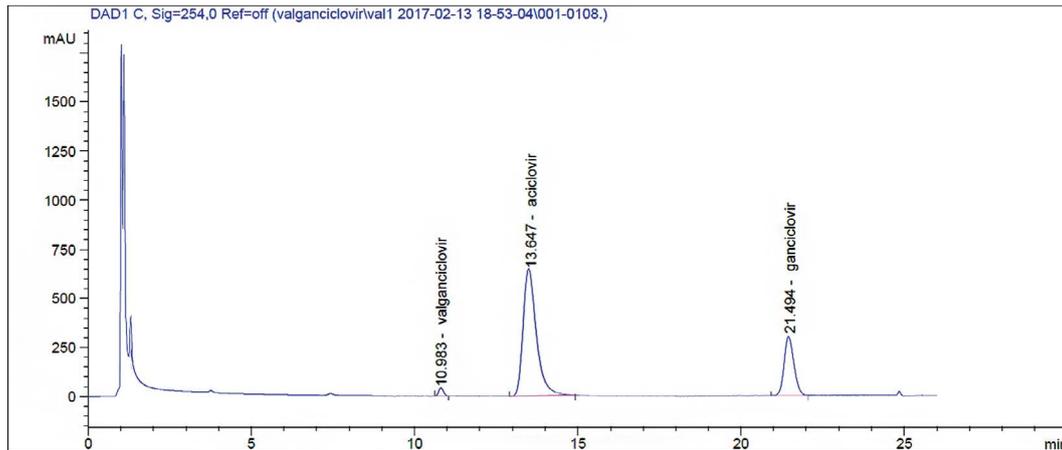


Рисунок 7. Хроматограмма образца с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО

Figure 7. Chromatogram of the sample with the content of the studied substances at the level LLOQ

в течение 30 дней при температуре -45°C) исследуемых веществ на уровнях №№ 2 и 7, указанных в таблице 2.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочного образца на уровне № 7 и образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам валганцикловира, ганцикловира и ацикловира с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,0–1000,0 нг/мл для валганцикловира и 100,0–10000,0 нг/мл для ганцикловира в плазме крови человека. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих валганцикловир.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Teshima D., Otsubo K., Yoshida T., Itoh Y., Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2003; 17(8): 500–503. DOI: 10.1002/bmc.258.
- Czock D., Scholle C., Rasche F. M., Schaarschmidt D., Keller F. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir in renal impairment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002; 72(2): 142–150. DOI: 10.1067/mcp.2002.126306.
- Perrottet N., Beguin A., Meylan P., Pascual M., Manuel O., Buclin T., Biollaz J., Decosterd L. A. Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography–spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples. *Journal of Chromatography B*. 2007; 852(1-2): 420–429. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.01.045.
- Karpov I. A., Solovey N. V. Valganciclovir as a highly effective drug for the prevention and treatment of herpetic infections. *Medical news*. 2018; 3: 282 (in Russ.).
- Padullés A., Colom H., Armendariz Y., Cerezo G., Caldes A., Pou L., Torras J., Grinyó J. M., Lloberas N. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography–UV detection. *Clinical biochemistry*. 2012; 45(4-5): 309–314. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.014.
- Singh O., Saxena S., Mishra S., Khuroo A., Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clinical biochemistry*. 2011; 44(10-11): 907–915. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.003.
- Chu F., Kiang C. H., Sung M. L., Huang B., Reeve R. L., Tarnowski T. A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1999; 21(3): 657–667. DOI: 10.1016/S0731-7085(99)00161-2.
- Dao Y. J., Jiao Z., Zhong M. K. Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2008; 867(2): 270–276. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.04.022.
- Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B. Simultaneous determination of abacavir, efavirenz and valganciclovir in human serum samples by isocratic HPLC-DAD detection. *Chromatographia*. 2007; 66(1): 25–30.
- Xu H. R., Li X. N., Chen W. L., Liu G. Y., Chu N. N., Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2007; 848(2): 329–334. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.053.
- Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. T. II. M.: *Grif and K*. 2013: 280 (in Russ.).
- Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.