<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128>
УДК 615.03

Оригинальная статья/Research article

Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров^{1*}, И. Е. Шохин¹, М. А. Токарева², О. А. Арчакова¹, Д. С. Богданова¹,
А. В. Алешина¹, Н. С. Багаева¹, В. В. Давыданова¹

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.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; М. А. Токарева – <https://orcid.org/0000-0001-7684-358X>;
О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Д. С. Богданова – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; А. В. Алешина – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;
Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; В. В. Давыданова – <https://orcid.org/0000-0003-2727-2148>.

Статья поступила: 11.01.2021. Статья принята в печать: 12.02.2021. Статья опубликована: 25.02.2021

Резюме

Введение. В настоящее время физико-химические методы анализа активно используются для определения содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях. Особенно широкое распространение приобрела высокоэффективная жидкостная хроматография с различными способами детектирования. Одной из наиболее сложных практических задач является хроматографическое разделение так называемых слабоудерживаемых соединений – лекарственных веществ, плохо удерживаемых на хроматографической колонке. Одними из таких веществ являются валганцикловир и ганцикловир.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки использован способ осаждения ацетонитрилом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,00–1000,00 нг/мл для валганцикловира и 50,00–10000,00 нг/мл для ганцикловира в плазме крови. Аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения исследований фармакокинетики препаратов валганцикловира и ганцикловира.

Ключевые слова: валганцикловир, ганцикловир, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, биоэквивалентность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, М. А. Токарева, О. А. Арчакова, Д. С. Богданова, А. В. Алешина, В. В. Давыданова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В. Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):120–128. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128>

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

Timofey N. Komarov^{1*}, Igor E. Shohin¹, Margarita A. Tokareva², Olga A. Archakova¹,
Dana S. Bogdanova¹, Alexandra A. Aleshina¹, Natalia S. Bagaeva¹, Veronika V. Davydanova¹

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.komarov@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Margarita A. Tokareva – <https://orcid.org/0000-0001-7684-358X>;
Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Bogdanova – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;
Alexandra A. Aleshina – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
Veronika V. Davydanova – <https://orcid.org/0000-0003-2727-2148>.

Received: 11.01.2021. Revised: 12.02.2021. Published: 25.02.2021

Abstract

Introduction. Currently, physicochemical methods of quantification are actively used to determine the content of drugs in biological fluids. High-performance liquid chromatography with various detection methods is particularly widespread. One of the most difficult practical tasks is the chromatographic separation of so-called poorly retained compounds – drug substances poorly retained on the chromatographic column. Valganciclovir and Ganciclovir are among such substances.

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., 2021

© Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., 2021

Aim. The aim of this study is to develop a method for valganciclovir and ganciclovir in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS) for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of valganciclovir and ganciclovir in plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation.

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

Conclusion. The method of the determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The linearity in plasma sample was achieved in the concentration range of 5.00–1000.00 ng/ml for valganciclovir and 50.00–10000.00 ng/ml for ganciclovir. Method could be applied to valganciclovir and ganciclovir determination in plasma for PK and BE studies.

Keywords: valganciclovir, ganciclovir, plasma, HPLC-MS/MS, validation, bioequivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Margarita A. Tokareva, Olga A. Archakova, Dana S. Bogdanova, Alexandra A. Aleshina, Veronika V. Davydanova have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out 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: Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V. Development and validation of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):120–128. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время физико-химические методы анализа активно используются для определения содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях. Особенно широкое распространение приобрела высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с различными способами детектирования. В зависимости от условий хроматографирования и используемого детектора возможно разделять и определять вещества с различными свойствами, что особенно эффективно для количественного определения близких по структуре веществ. Вместе с тем одной из наиболее сложных практических задач является хроматографическое разделение так называемых слабоудерживаемых соединений – лекарственных веществ, плохо удерживаемых на хроматографической колонке. С этой целью используются различные аналитические приёмы: применение гидрофильных колонок (например типа HILIC), ионообменных колонок, ион-парных реагентов в качестве элюентов. Однако использование данных подходов при применении масс-спектрометрического детектора, а также при определении лекарственных веществ в сложных биологических матрицах не всегда возможно и оправдано. Наглядно данную задачу можно рассмотреть на примере валганцикловира (ВАЛ) (valganciclovir (VAL) (рисунок 1) и ганцикловира (ГАН) (ganciclovir (GAN) (рисунок 2).

Ганцикловир был разработан как препарат для терапии цитомегаловирусной инфекции, впоследствии было выявлено ингибирование *in vitro* других герпетических вирусов, включая вирус герпеса человека 1 и 2 типов, а также вирусов Эпштейна – Барр, ветря-

Рисунок 1. Структурная формула валганцикловира

Figure 1. Chemical structure of valganciclovir

Рисунок 2. Структурная формула ганцикловира

Figure 2. Chemical structure of ganciclovir

ной оспы, герпеса человека 6 типа и обезьяньего вируса герпеса типа В [1]. Изначально в фармакотерапии использовался ганцикловир, однако его низкая биодоступность обуславливала необходимость внутривенного введения. Для повышения биодоступности было разработано пролекарство – валганцикло-

вир, превращающееся в процессе метаболизма в ганцикловир, который оказывает фармакологическое действие [2, 3].

Вместе с тем валганцикловир и ганцикловир, как и многие противовирусные лекарственные средства, обладают достаточно выраженными гидрофильными свойствами, что демонстрируют значения коэффициента распределения «октанол – вода» (log P) для данных веществ (таблица 1).

Таблица 1. Log P и pKa для валганцикловира, ганцикловира и ацикловира

Table 1. Log P and pKa for valganciclovir, ganciclovir and acyclovir

	Валганцикловир Valganciclovir	Ганцикловир Ganciclovir	Ацикловир (внутренний стандарт) Acyclovir (internal standard)
Log P	–0,81	–1,66	–0,95
pKa	10,16	8,71	11,98
Ссылка Reference	[4]	[5]	[6]

Основываясь на химических свойствах данных веществ, следует учитывать особенности хроматографического поведения, детектирования веществ, а также пробоподготовки. В литературных источниках приведены различные методики определения исследуемых веществ в биожидкостях при помощи метода ВЭЖХ в сочетании с осаждением 6%-м водным раствором хлорной кислоты и детектированием ультрафиолетовым детектором (УФ) [7], осаждением 50%-м водным раствором трифторуксусной кислоты с УФ-детектированием [8] для ганцикловира; осаждением ацетонитрилом и масс-спектрометрическим детектированием (МС) [9], а также осаждение ацетонитрилом с диодно-матричным детектированием [10] для валганцикловира. При этом следует отметить, что данные методики были приведены для определения только одного вещества: либо валганцикловира, либо ганцикловира. Ранее нами была разработана методика совместного определения для валганцикловира и ганцикловира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ [11]. Данная методика была единственной из описанных в научной литературе, которая позволяет одновременно определять валганцикловир и ганцикловир вышеуказанным методом. Однако при проведении исследований возникали дополнительные сложности, требовавшие использования специфической хроматографической колонки YMC-Pack Polyamine II и установления потока элюента на уровне 2 мл/мин, что значительно увеличивало расход реагента. Кроме того, для достижения оптимального разделения исследуемых веществ и внутреннего стандарта время анализа одного образца составляет 26 минут, что значительно увеличивает время исследования в целом.

Использование МС-детектирования позволяет достичь оптимального хроматографического разделения, при этом уменьшить скорость потока элюен-

та и значительно сократить время анализа одного образца, что позволяет снизить затраты. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения ацетонитрилом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащённом градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (класс «HPLC-grade», J.T.Baker, Нидерланды); ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды/Израиль); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания); аммиак водный (класс «for analysis», PanReac, Испания); вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы валганцикловира гидрохлорида (USP reference standard, количественное содержание 99,2 %), ганцикловира (USP reference standard, количественное содержание 97,5 %) и ацикловира (USP reference standard, количественное содержание 94,6 %).

Исходные стандартные растворы валганцикловира, ганцикловира и внутреннего стандарта (ВС) (internal standard (IS) ацикловира (АЦИ) (acyclovir (ACI) готовили путем растворения навески субстанций в метаноле; смешанные рабочие стандартные растворы валганцикловира и ганцикловира и рабочий раствор ВС ацикловира готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций в плазме крови, соответствующих уровням 1–9, а также уровням LLOQ (lower limit of quantification), L (low), M (middle) и H (high) (таблица 2).

Исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 200 мкл калибровочного образца, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС ацикловира, затем прибавляли 600 мкл ацетонитрила, перемешивали на встря-

хивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на калибровочных уровнях

Table 2. Concentrations of analytes at calibration levels

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml		Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
	ВАЛ VAL	ГАН GAN	АЦИ ACI
1	5,00	50,00	1000,00
2	10,00	100,00	1000,00
3	25,00	250,00	1000,00
4	50,00	500,00	1000,00
5	100,00	1000,00	1000,00
6	250,00	2500,00	1000,00
7	400,00	4000,00	1000,00
8	750,00	7500,00	1000,00
9	1000,00	10000,00	1000,00
LLOQ	5,00	50,00	1000,00
L	15,00	150,00	1000,00
M	500,00	5000,00	1000,00
H	800,00	8000,00	1000,00

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Хроматографическая колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму); элюент В: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, 10%-й раствор воды Milli-Q с прибавлением 0,08 % аммиака в ацетонитриле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы (ПФ) представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока ПФ, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min
0,00	85,00	15,00	1,00
0,70	85,00	15,00	
3,50	90,00	10,00	
4,00	0,00	100,00	
5,50	0,00	100,00	
5,70	85,00	15,00	
7,00	85,00	15,00	

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–7,00 мин.

- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 200 °С, напряжение на капилляре +5,0 кВ.
- Режим ионизации: положительный.
- Условия детектирования валганцикловира: 355,20 m/z → 152,05 m/z.
- Условия детектирования ганцикловира: 255,80 m/z → 152,00 m/z; 255,80 m/z → 134,90 m/z.
- Условия детектирования ацикловира: 226,00 m/z → 152,00 m/z, 226,00 m/z → 134,95 m/z.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Особенностью разработки методики хроматографического разделения данных веществ является их слабое удерживание на «классических» колонках с октадецилсиликагелем. Использование колонки с привитыми аминогруппами также не привело к хорошему удерживанию и надлежащему разделению данных веществ. Были испытаны также колонки с октадецилсиликагелем, но с разным общим содержанием углерода (таблица 4).

Таблица 4. Некоторые свойства хроматографических колонок, использовавшихся в исследовании

Table 4. Some properties of chromatographic columns used in the study

Хроматографическая колонка Chromatographic column	Общее содержание углерода, % Total carbon content, %	Площадь поверхности, м²/г Surface area, m²/g
Phenomenex Luna C18(2) 50 × 2 mm, 5 µm	18,2	393
Phenomenex Luna NH2 50 × 3 mm, 5 µm	10,2	420
Waters XBridge C18 50 × 4,6 mm, 3,5 µm	18,0	178
YMC Hydrosphere C18 100 × 2 mm, 3 µm	12,2	330
Shim-pack GWS 150 × 4,6 mm, 5 µm	9,5	450

Наилучшие результаты были получены при использовании колонки Shim-Pack GWS с наименьшим общим содержанием углерода. Несмотря на незначительное удерживание исследуемых веществ на данной колонке, тем не менее хроматографические пики отделены от «мёртвого» объёма, а методика соответствует требованиям нормативной документации по валидационным параметрам, в том числе по параметру «селективность».

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств, том I [12], а также руководств

FDA [13] и EMA [14] по следующим параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и ВС; краткосрочная стабильность («насто́льная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналитов в матрице].

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, а также образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации валганцикловира 5,00 нг/мл и ганцикловира 50,00 нг/мл. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и образцов с повышенным содержанием липидов. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемых веществ и ВС, не превышают 20 % от сигнала на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала ВС соответственно. Соответствующая хроматограмма приведена ниже на рисунке 3.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов валганцикловира, ганцикловира и рабочего раствора ВС ацикловира без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме, без учёта влияния степени извлечения валганцикловира, ганцикловира и ацикловира из биологической матрицы.

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

Эффект матрицы был оценен на низком (уровень L) и высоком (уровень H) уровнях аналитических диапазонов концентраций валганцикловира и ганцикловира (таблица 2). Для ВС ацикловира эффект матрицы был рассчитан на уровне 1000,00 нг/мл. Данные представлены в таблицах 5 и 6.

Калибровочная кривая

Проводили анализ девяти образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС ацикловира и рабочих стандартных растворов вал-

Таблица 5. Расчёт фактора матрицы валганцикловира, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 5. The matrix factor of valganciclovir calculations, normalized by the IS matrix factor

№	Mf ВАЛ (уровень L) Mf of VAL (level L)	Mf АЦИ (уровень L) Mf of ACI (level L)	Нормализованный Mf (уровень L) Normalised Mf (level L)	Mf ВАЛ (уровень H) Mf of VAL (level H)	Mf АЦИ (уровень H) Mf of ACI (level H)	Нормализованный Mf (уровень H) Normalised Mf (level H)
1	0,91	1,00	0,90	1,00	0,99	1,01
2	0,87	1,00	0,87	0,99	1,02	0,97
3	0,91	1,01	0,90	0,98	0,99	0,99
4	0,92	1,02	0,91	1,01	1,01	1,00
5	0,90	0,99	0,91	0,99	1,02	0,97
6	0,94	1,01	0,93	1,01	1,02	0,99
Среднее Average			0,90	Среднее Average		0,99
CV, %			2,18	CV, %		1,50

Таблица 6. Расчёт фактора матрицы ганцикловира, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 6. The matrix factor of ganciclovir calculations, normalized by the IS matrix factor

№	Mf ГАН (уровень L) Mf of GAN (level L)	Mf АЦИ (уровень L) Mf of ACI (level L)	Нормализованный Mf (уровень L) Normalised Mf (level L)	Mf ГАН (уровень H) Mf of GAN (level H)	Mf АЦИ (уровень H) Mf of ACI (level H)	Нормализованный Mf (уровень H) Normalised Mf (level H)
1	1,18	1,00	1,17	1,04	0,99	1,04
2	0,98	1,00	0,98	0,82	1,02	0,81
3	0,97	1,01	0,97	0,84	0,99	0,85
4	1,14	1,02	1,12	0,99	1,01	0,98
5	1,29	0,99	1,30	0,85	1,02	0,84
6	1,21	1,01	1,19	1,00	1,02	0,98
Среднее Average			1,12	Среднее Average		0,92
CV, %			11,56	CV, %		10,58

ганцикловира и ганцикловира до концентраций, указанных в таблице 2 (уровни 1–9). По полученным значениям были построены калибровочный график в координатах отношение площади пика валганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации валганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови (рисунок 5), а также калибровочный график в координатах отношение площади пика ганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации ганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови (рисунок 6). Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Хроматограмма образца на уровне 9 (таблица 2) представлена на рисунке 4.

Рисунок 4. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень 9

Figure 4. Level 9 plasma sample chromatogram

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 representing dependence of the ratio area peak of valganciclovir to acyclovir on the concentration ratio of valganciclovir to the acyclovir 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 representing dependence of the ratio area peak of ganciclovir to the acyclovir on the concentration ratio of ganciclovir to the acyclovir in plasma

Точность и прецизионность

Проводили анализ образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M и H (таблица 2). Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность были оценены внутри цикла, между двумя циклами и между тремя циклами, данные приведены в таблице 7.

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

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы, без влияния степени извлечения на уровнях L, M, и H (таблица 2), а также образцы контроля качества для оценки степени извлечения. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и с повышенным содержанием липидов. Данные представлены в таблице 8.

Степень извлечения не должна быть равной 100 %, но необходимо обеспечить эффективное и воспроизводимое извлечение веществ из биологической матрицы. Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения аналита из биологических матриц не должно превышать 15 %.

Нижний предел количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация валганцикловира и ганцикловира в плазме

крови в аналитических диапазонах, для которых возможно количественное определение валганцикловира и ганцикловира со значениями RSD и E не более 20 %. НПКО составил 5,00 нг/мл для валганцикловира и 50,00 нг/мл для ганцикловира. Хроматограммы плазмы крови с содержанием валганцикловира и ганцикловира на уровне НПКО приведена на рисунке 7. Предел обнаружения валганцикловира для данной методики составил около 0,93 нг/мл, а предел обнаружения ганцикловира – 0,73 нг/мл (отношение сигнал/шум 3,0).

Таблица 8. Оценка степени извлечения валганцикловира и ганцикловира на уровнях L, M, и H из различных биологических матриц

Table 8. Calculation of valganciclovir and ganciclovir recovery at L, M, H levels from different biological matrix

	СИ (уровень L), % Recovery (level L), %	СИ (уровень M), % Recovery (level M), %	СИ (уровень H), % Recovery (level H), %
<i>Валганцикловир</i> <i>Valganciclovir</i>			
Среднее Average	88,57	98,94	101,80
SD	6,78	2,76	2,48
RSD	7,66	2,79	2,43
<i>Ганцикловир</i> <i>Ganciclovir</i>			
Среднее Average	93,98	90,95	98,01
SD	8,64	9,83	4,44
RSD	9,20	10,80	4,53

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («настолярная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабиль-

Таблица 7. Точность и прецизионность методики

Table 7. Accuracy and precision of the method

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Average found, ng/ml			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> <i>Valganciclovir</i>												
5,00	5,80	5,45	5,29	0,08	0,62	0,56	1,37	11,35	10,53	16,08	8,96	5,89
15,00	14,46	14,08	13,72	0,62	0,75	0,80	4,26	5,31	5,86	-3,63	-6,11	-8,52
500,00	550,73	561,04	563,16	5,21	12,53	10,69	0,95	2,23	1,90	10,15	12,21	12,63
800,00	893,66	901,00	900,88	12,41	13,06	12,59	1,39	1,45	1,40	11,71	12,62	12,61
<i>Ганцикловир</i> <i>Ganciclovir</i>												
50,00	48,32	47,39	47,18	1,13	2,33	2,06	2,33	4,91	4,37	-3,35	-5,21	-5,65
150,00	145,73	143,35	141,91	6,62	6,30	5,73	4,27	4,39	4,04	-2,85	-4,44	-5,39
5000,00	4740,25	4808,83	4892,22	77,26	104,66	153,94	1,63	2,18	3,15	-5,19	-3,82	-2,16
8000,00	7198,32	7372,03	7482,18	146,29	225,72	252,41	2,03	3,06	3,37	-10,02	-7,85	-6,47

Рисунок 7. Хромограмма образца плазмы крови, уровень НПКО

Figure 7. LLOQ plasma sample chromatogram

ность стандартных растворов (при хранении в течение 30 дней при температуре -45°C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 59 дней при температуре -45°C) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочного образца с наибольшей концентрацией и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и ВС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения валганцикловира, ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,00–1000,00 нг/мл для валганцикловира и 50,00–10000,00 нг/мл для ганцикловира в плазме крови человека. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики валганцикловира и ганцикловира.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпов И. А., Соловей Н. В. Валганциклови́р как высокоэффективное лекарственное средство профилактики терапии герпетических инфекций. *Медицинские новости*. 2018;3:56–59.
2. 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.
3. 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.
4. Valganciclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01610>.
5. Ganciclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01004>.
6. Acyclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00787>.
7. 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.
8. 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.
9. Heinig K., Wirz T., Gajate-Perez A., Belli S. Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(5-6):436–442. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.12.033.
10. 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. DOI: 10.1365/s10337-007-0302-y.
11. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Аleshina A. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139.
12. Миронов А. Н., ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К; 2013. 280 с.
13. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
14. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.

REFERENCES

1. Karpov I. A., Salavei M. U. Valganciclovir as a highly effective drug for the prevention and treatment of herpes infections. *Meditsinskie novosti*. 2018;3:56–59. (In Belarus).
2. 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.
3. Singh O., Saxena S., Mishra S., Khuroo A., Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by li-

- quid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clinical Biochemistry*. 2011;44(10-11):907–915. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.003.
4. Valganciclovir [Internet]. DRUGBANK. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01610>.
 5. Ganciclovir [Internet]. DRUGBANK. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01004>.
 6. Acyclovir [Internet]. DRUGBANK. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00787>.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Heinig K., Wirz T., Gajate-Perez A., Belli S. Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(5-6):436–442. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.12.033.
 10. 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. DOI: 10.1365/s10337-007-0302-y.
 11. Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshtina 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. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):133–139. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139.
 12. Mironov A. N. *Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for the examination of medicines]. V. II. Moscow: Grif i K; 2013: 280 p. (In Russ.).
 13. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
 14. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.

XVI АПТЕЧНЫЙ САММИТ

Эффективное управление аптечной сетью

12 марта 2021 г., Москва

ОБЗОР РЫНКА 360°. Влияние пандемии на аптечный ритейл: какие ключевые отличия от первой волны?

РЕГУЛЯТОР И ВСЕ ВОКРУГ НЕГО: какие законодательные изменения определяют настоящее и будущее аптек?

ВСЬ РЫНОК НА ОДНОЙ ПЛОЩАДКЕ. Малые, средние и большие сети вместе ищут решения своих проблем

НОВЫЕ ФОРМАТЫ. Форсайт-сессия, блиц-интервью, дебаты, сторителлинг, брейншторминг.
Самые жаркие дискуссии на самые важные темы

МОЩНЕЙШИЙ НЕТВОРК — это отличный шанс найти новые возможности для бизнеса, а также партнеров в индустрии

18+

Регистрация на сайте: infor-media.ru

Подробности по тел. +7 495 995-80-04 и по e-mail e.pronenko@infor-media.ru