# НАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА . БИКАЛУТАМИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения Markets and Applications Programs



# **Авторы**

Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, Т.Н. Комаров, Ю.В. Медведев, Ю.Е. Болдина, А.А. Львова, Л.А. Меньшикова

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8.



The Mea sure of Confidence

Разработана методика количественного определения противоопухолевого препарата бикалутамида в плазме крови с применением ВЭЖХ с УФ-детектированием. Проведена валидация методики по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (на уровнях intraday и inter-day), прецизионность (на уровнях intra-day и inter-day), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов. Аналитический диапазон методики составил 0,1 — 5 мкг/мл. Методика может быть пригодна для фармакокинетических исследований бикалутамида, в том числе исследований биоэквивалентности.

Ключевые слова: ВЭЖХ, плазма, бикалутамид, валидация.

# Введение

Бикалутамид — современный противоопухолевый препарат, применямый для лечения рака предстательной железы на различных стадиях, в том числе и на метастазирующих. Механизм действия бикалутамида связан с подавлением активности андрогенных гормонов путём связывания специфических андрогенных рецепторов, тем самым, бикалутамид является антагонистом андрогенных гормонов, таких как тестостерон и дигидротестостерон [1]. Кроме того, бикалутамид усиливает разрушение андрогенных рецепторов. Бикалутамид не проникает через гематоэнцефалический барьер. Кроме того, несмотря на то, что бикалутамид в сочетании с другими гормонподавляющими препаратами может значительно влиять на сексуальную функцию мужчины [2], при проведении монотерапии рака предстательной железы при помощи бикалутамида, либо в сочетании с неселективными цитостатиками, влияние бикалутамида на сексуальную функцию мужчин практически минимально. Бикалутамид часто используется в виде монотерапий, в сочетании с гонадотропин-рилизинг-гормоном или неспецифическими цитостатиками [1].



Кроме того, современная фармакотерапия также использует бикалутамид для лечения крайних стадий гирсутизма у женщин [3].

Химически бикалутамид представляет собой фторированное замещённое производное бензолсульфоновой кислоты. Структура бикалутамида представлена на рис. 1.

Рисунок 1. Структурная формула бикалутамида.

В связи с последними заявлениями правительства Российской Федерации об особой важности импортозамещения лекарственных средств для отечественной фармацевтической промышленности, учитывая сохраняющуюся высокую заболеваемость онкологическими заболеваниями в Российской Федерации, следует ожидать увеличения доли препаратов бикалутамида на российском рынке. На данный момент, отечественная фармацевтическая промышленность не всегда способна предоставить качественный продукт, способный конкурировать с зарубежными аналогами. Важным шагом для решения этой проблемы является совершенствование методов исследования сравнительной фармакокинетики отечественных препаратов зарубежным аналогам, что в сочетании с востребованностью препарата, объясняет необходимость разработки и валидации методики определения бикалутамида в плазме крови человека.

Для количественного определения бикалутамида в плазме крови человека и лабораторных животных применяются методы ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием после осаждения белков смесью оцетонитрила и кислоты хлорной (предел количественного определения — 10 мкг/мл) [4], УФ-спектрофотометрическим детектированием после проведения твердофазной экстрации [5], одноквадрупольным массдетектором (предел количественного определения — 1 мкг/мл) [6]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований препаратов бикалутамида. В качестве пробоподготовки применяют методы осаждения белков ацетонитрилом, метанолом, хлорной кислотой и др. На основании изученых литературных данных нами был выбран метод ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием и в качестве метода пробоподготовки — осаждение белков трифторуксусной кислотой.

# Материалы и методы

# Приборы

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II, оснащенном 4-х канальным градиентным насосом, автосамплером, термостатом колонок, фотодиодноматричным детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation, Agilent Technologies, США.

# Используемые реактивы

Стандартный образец: бикалутамид, субстанция - порошок (99,9%), годен до 04.2017; ацетонитрил (gradient grade, Scharlau, Испания); трифторуксусная (extra pure, Sigma Aldrich); вода очищенная; вода Milli-Q.

# Методика пробоподготовки

Для приготовления исходного стандартного раствора точную навеску субстанции бикалутамида растворяли в ацетонитриле. Стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора водой очищенной.

Пробоподготовку образцов плазмы проводили следующим образом: к 500 мкл образца плазмы крови с содержанием бикалутамида (или 400 мкл холостой плазмы с прибавлением 100 мкл стандартного раствора бикалутамида) прибавляли 250 мкл 50% раствора трифторуксусной кислоты, встряхивали на вортексшейкере в течение 20 с, далее центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об/мин и отбирали 600 мкл надосадочной жидкости, которую переносили в виалы для хроматографа.

# Условия хроматографирования

Подвижная фаза: вода, подкисленная трифторуксусной кислотой до рН 2,5(A)/ацетонитрил (B) (соотношение

41:59, изократическое элюирование), предварительно профильтрованная и дегазированная на устройстве для фильтрования под вакуумом. Для разделения была использована хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C18 250\*4,6 мм, 5 мкм при температуре 35 °C с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18 12,5\*4,6 мм, 5 мкм. Объём вводимой пробы: 10 мкл.

Время анализа: 10 мин.

# Условия детектирования

Для детектирования использовался фотодиодноматричный детектор при длине волны поглощения 270 нм.

# Результаты и их обсуждение

### Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили согласно «Руководству по экспертизе лекарственных средств» [7], а также Руководств FDA [8] и EMA [9] по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (на уровнях intra-day и interday), прецизионность (на уровнях intra-day и interday), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов.

## Селективность

Проводили анализ 7 образцов холостой плазмы, образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора бикалутамида в диапазоне концентраций 0,1 мкг/мл — 5,0 мкг/мл. На хроматограммах образцов холостой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания бикалутамида. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рис. 2 и 3.

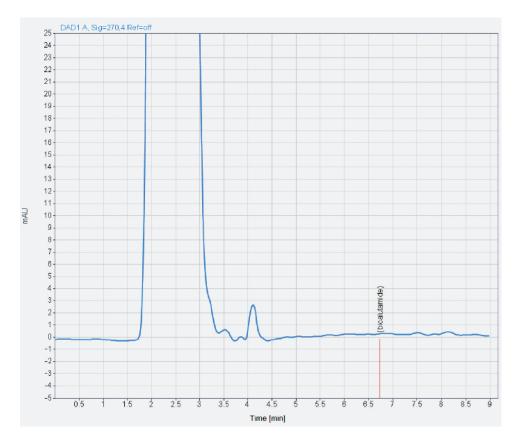


Рисунок 2. Хроматограмма образца холостой плазмы.

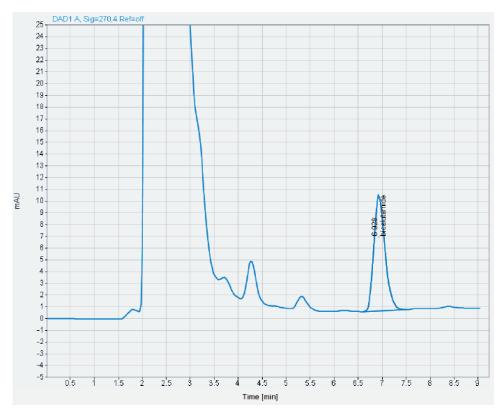
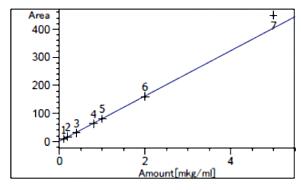


Рисунок З. Хроматограмма образца холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора бикалутамида (уровень 2,0 мкг/мл).

## Линейность

Проводили анализ 7 образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора бикалутамида до получения концентраций: 0,1мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл,

0,8 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 2,0 мкг/мл и 5,0 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ( $r^2 = 0.9919$  и  $r^2 = 0.9923$ ), приведенный на Рис.4.



bicalutamide at exp. RT: 6.948 DAD1 A, Sig=270,4 Ref=off Correlation: 0.99705 Residual Std. Dev.: 18.36532

Formula: y = mx + b m: 80.72018 b: 6.44695e-1 x: Amount[mkg/ml]

y: Area

Рисунок 4. Калибровочный график зависимости площади пика бикалутамида от концентрации в плазме.

Полученный коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, приведены в таблице 1. Полученные отклонения

соответствуют нормам Руководства по экспертизе лекарственных средств, FDA и EMA (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

С <sub>факт</sub> , мкг/мл	0,10	0,20	0,40	0,80	1,0	2,0	5,0
С <sub>рассчит</sub> , мкг/мл	0,098	0,225	0,421	0,879	1,083	1,863	4,516
ε, %	2,00	12,50	5,25	9,88	8,30	6,85	9,68
Норма	Не более 20 %	Не более 15%					

Таблица 1. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений.

### Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности роводили анализ 4 образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора бикалутамида до получения концентраций: 0,1 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 2,0 мкг/мл, 5,0 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали по 5 раз. Исследование проводили в течение 1-ой

последовательности (intra-day) и 2-ой последовательности (inter-day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\epsilon$ , %), приведенные в Таблицах 2 и 3.

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
0,10	0,098	0,101	0,006	6,33	0,50
	0,100				
	0,101				
	0,105				
	0,096				
	0,421	0,423	0,025	6,02	5,75
0,40	0,415				
	0,419				
	0,405				
	0,441				
	1,863	1,912	0,027	1,41	4,40
2,0	1,897				
	1,893				
	1,893				
	1,931				
5,0	4,516	4,605	0,006	0,12	7,90
	4,606				
	4,616				
	4,601				
	4,609				

Таблица 2. Точность и прецизионность методики (внутри цикла).

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
0,10	0,108	0,096	0,007	7,48	4,50
	0,110				
	0,091				
	0,088				
	0,093				
	0,419	0,414	0,018	4,35	3,50
0,40	0,412				
	0,407				
	0,405				
	0,405				
	1,848	1,942	0,047	2,42	2,89
2,0	2,043				
	1,991				
	1,904				
	1,992				
5,0	4,411	4,493	0,103	2,28	10,14
	4,416				
	4,420				
	4,413				
	4,421				

Таблица 3. Точность и прецизионность методики (между циклов).

Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\epsilon$ , %) на уровне между циклов использовались данные (n=10) полученные в течение 1-ой последовательности (intra-day) и 2-ой последовательности (inter day).

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствуют нормам (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек).

# Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация бикалутамида в плазме, для которой возможно определение аналита со значениями RSD и є не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 0,1 мкг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 5.

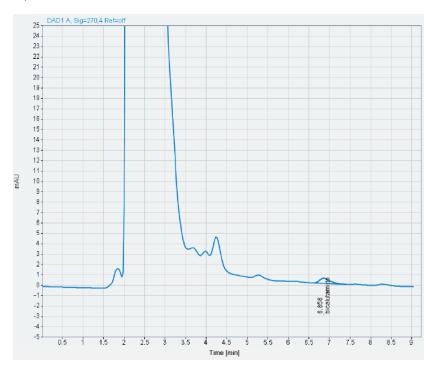


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы с содержанием бикалутамида на уровне ПКО.

# Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов бикалутамида (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре от 2 °C до 8 °C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 48 ч при анализе на следующий день при температуре 15 °C), на уровне концентрации 5,0 мкг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

### Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией бикалутамида 5,0 мкг/мл и холостой плазмы на хроматограмме холостой плазмы отсутствовали пики, соответствующие бикалутамиду. Перенос пробы не отмечен.

# Заключение

Разработана методика количественного определения бикалутамида в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с применением новейшей хроматографической системы Agilent 1290 Infinity II. По результатам валидации было показано, что методика обладает достаточной селективностью, точностью, чувствительностью и может быть применена для определения бикалутамида в плазме крови с целью исследования фармакокинетики препарата бикалутамида, в том числе для сравнительных фармакокинетических исследований воспроизведенных ЛС. Методика была валидирована по показателям: селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения, стабильность и перенос пробы и может быть использована для фармакокинетических исследований, в том числе исследований биоэквивалентности.

# Список литературы

- Furr BJ. "The development of Casodex (bicalutamide): preclinical studies". European Urology, 1996, 29 Suppl 2: 83–95
- Mason M "What implications do the tolerability profiles of antiandrogens and other commonly used prostate cancer treatments have on patient care?". Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.132. 2006. Suppl 1: S27–35.
- Hywel Williams; Michael Bigby; Thomas Diepgen; Andrew Herxheimer; Luigi Naldi; Berthold Rzany (22 January 2009). Evidence-Based Dermatology. John Wiley & Sons. pp. 529.
- Ajeet Kumar Singh, Akash Chaurasiya, Gaurav K. Jain. High performance liquid chromatography method for the pharmacokinetic study of bicalutamide SMEDDS and suspension formulations after oral administration to rats. Talanta, 78, Issues 4–5, 15 June 2009, Pages 1310–1314.
- Mark S. Soloway, M.D., Paul F. Schellhammer, Bicalutamide in the treatment of advanced prostatic carcinoma: a phase II multicenter trial Urology 47, Issue 1, Supplement 1, January 1996, Pages 33–37.
- SeungHwan Lee, MD, MD,Bo-Hyung Kim, Comparative pharmacokinetic evaluation of two formulations of bicalutamide 50-mg tablets: An open-label, randomizedsequence, single-dose, two-period crossover study in healthy Korean male volunteers Clinical Therapeutics, 31, Issue 12, December 2009, Pages 3000–3008.

- 7. Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под. ред. проф. А. Н. Миронова. Том 1. М.: Гриф и К, **2013**, 328 с.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation.
   U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER).
   U.S. Government Printing Office:
   Washington, DC: Government Printing Office, 2013.
- Guideline on validation of bioanalytical methods (draft).
   European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human Use (CHMP). London. 2011.

<u>Контакты: Agilent MAPs:</u> maps\_agilent@agilent.com

<u>Дополнительная информация:</u>
http://www.your-analytical-solution.com

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2015 Published in USA, August 1, 2015 5991-6112RURU

