

ПРОЦЕДУРА ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНОГО ПАРАМЕТРА “ЛІНІЙНІСТЬ/КАЛІБРУВАЛЬНА МОДЕЛЬ” АНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЯКИХ АНТИГІПЕРТЕНЗИВНИХ АНАЛІТІВ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вступ. Для вивчення фармакокінетики лікарських засобів надзвичайно актуальна розробка біоаналітичних методик аналізу. Проте зазвичай з метою підвищення ефективності фармакотерапії будь-якого захворювання, в тому числі гіпертонічної хвороби, пацієнту призначають декілька лікарських засобів одночасно або ж об'єктами вивчення є багатоконпонентні лікарські засоби, тому доцільно розробити біоаналітичну методику одночасного визначення декількох аналітів (інколи і їх метаболітів) у плазмі крові.

Мета дослідження – провести експериментальне вивчення валідаційного параметра “лінійність/калібрувальна модель” кількісного визначення амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу в плазмі крові для виконання фармакокінетичних досліджень.

Методи дослідження. Біоаналітична методика визначення амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу ґрунтується на ВЕРХ/МС/МС аналізі аналітів у досліджуваних розчинах, отриманих із зразків плазми після попереднього осадження білків.

Результати й обговорення. Доведено лінійну залежність між концентрацією та площею хроматографічних піків амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу в діапазоні концентрацій 0,1–10 нг/мл, 0,5–50 нг/мл та 5–500 нг/мл відповідно.

Висновок. Висновок щодо розробленої методики по валідаційному параметру “лінійність/калібрувальна модель” – коректна.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амлодипін; бісопролол; еналаприл; валідація; валідаційний параметр “лінійність/калібрувальна модель”.

ВСТУП. Одним із найважливіших етапів створення лікарських засобів є доклінічні та клінічні випробування, належне проведення яких гарантує в подальшому безпечність і високу терапевтичну ефективність розроблених лікарських засобів. Ключовим елементом доклінічних досліджень є різноманітні фармакологічні методики, при застосуванні яких здійснюють ряд аналітичних вимірювань на тих чи інших біологічних об'єктах. Тому ці методики класифікують як біоаналітичні.

Розробка методик аналізу – це багатостадійний динамічний процес. Розроблені методики потребують постійної адаптації, вдосконалення і модифікації, у зв'язку з чим необхідна ефективна процедура, що дозволяє не лише приймати рішення про адекватність розробленої методики, але й оптимізувати окремі етапи і методику в цілому.

© Л. С. Логойда, 2018.

Для отримання достовірних результатів, що можуть бути задовільно інтерпретовані, потрібно належним чином охарактеризувати біоаналітичні методики, які застосовують, повністю їх валідувати і задокументувати. Дослідження з питань валідації доволі добре представлені в наукових працях учених, але аналіз публікацій свідчить про те, що здебільшого порушуються та розкриваються питання валідації біоаналітичних методів визначення різних аналітів у біологічних рідинах. Таким чином, набувають актуальності питання, пов'язані з визначенням особливостей процесу валідації біоаналітичних методів, які використовують під час доклінічних фармакологічних досліджень лікарських засобів та розробки стандартизованих підходів до проведення таких валідаційних робіт. Біоаналітичні методи аналізу широко застосовують при вивченні фармакокінетики лікарських засобів. Аналіз у більшості випадків відбувається мето-

дом калібрувального графіка або у варіанті методу стандарту, що надзвичайно зручно та експресно, оскільки визначувані аналіти вже відомі та їх кількість для аналізу незначна і щодня виконується велика кількість аналізів. Тому метод калібрувального графіка, як і метод стандарту, широко використовують під час рутинного аналізу аналітів, що є актуальним для вивчення фармакокінетики лікарських засобів [1–6].

Мета дослідження – провести експериментальне вивчення валідаційного параметра “лінійність/калібрувальна модель” кількісного визначення амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу в плазмі крові для виконання фармакокінетичних досліджень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були амлодипін, бісопролол та еналаприл.

У кожен пробірку вносять по 50 мкл кожного розчину QC-зразків та 50 мкл розчинів кожного внутрішнього стандарту в 450 мкл бланкової плазми. Пробірки закривають та перемішують їх вміст на шейкері протягом 10 с. Вносять 50 мкл розчинів внутрішніх стандартів у 0,5 мл плазми, струшують 4 хв. Осадження білків проводять шляхом додавання 1,5 мл ацетонітрилу та струшування впродовж 4 хв, потім центрифугування при 4000 об./хв при 5 °С протягом 10 хв. До 1 мл прозорого розчину додають 1 мл води та виконують хроматографування. Проби хроматографують в ізократичному режимі з використанням хро-

матографічної колонки Eclipse C18, 100×4,6 мм, з розміром часток 3,5 мкм. Рухома фаза: ацетонітрил – 0,01 % розчин кислоти форміатної (100:0,1, v/v). Швидкість потоку – 0,7 мл/хв. Температура термостата колонки – 30 °С. Об'єм проби, яку вводять, – 5 мкл.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Біоаналітична методика визначення амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу ґрунтується на ВЕРХ/МС/МС аналізі аналітів у досліджуваних розчинах, отриманих із зразків плазми після попереднього осадження білків. Придатність біоаналітичної методики була підтверджена валідаційними характеристиками, які висувають до біоаналітичних методик [7, 8]. У даній роботі описано валідаційний параметр “лінійність/калібрувальна модель”. Розроблено електронні протоколи з використанням Microsoft Excel, де передбачено поля для введення даних.

Лінійність калібрувальної кривої оцінюють за калібрувальними стандартами амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу, приготовленими на плазмі крові, використовуючи алгоритм розрахунків параметрів лінійної регресії методом найменших квадратів у системі координат “відношення площ хроматографічних піків аналіту або внутрішнього стандарту до концентрації”. Калібрувальні криві представлено на рисунках 1–6. При побудові калібрувальної кривої необхідно виконати такі умови: для нижньої межі

Regression Equation: $y = 0.0266x + 0.0093$ ($r = 0.9990$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
0.1	1	0.10	101.9	NaN	NaN
0.2	1	0.19	94.1	NaN	NaN
0.5	1	0.51	101.7	NaN	NaN
0.8	1	0.81	101.3	NaN	NaN
1	1	1.07	106.6	NaN	NaN
5	1	4.91	98.3	NaN	NaN
9	1	8.69	96.6	NaN	NaN
10	1	9.96	99.6	NaN	NaN

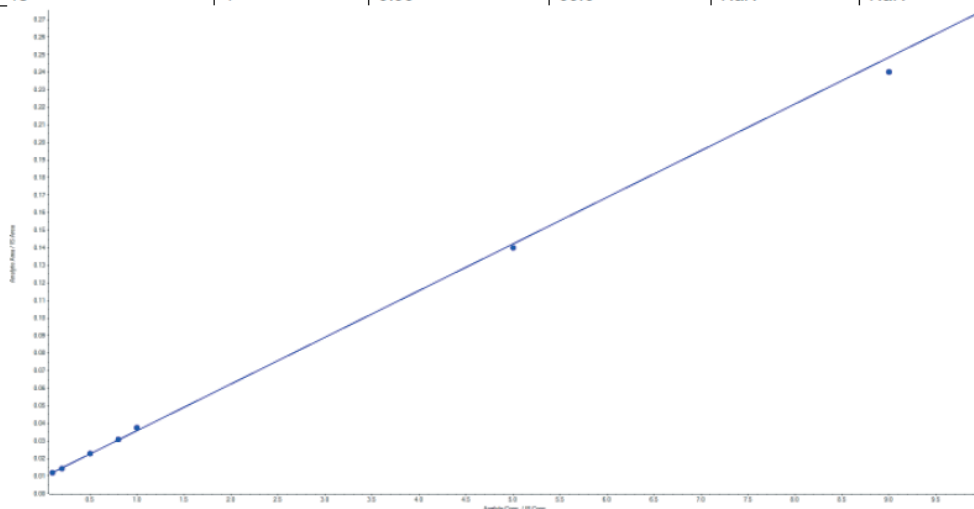


Рис. 1. Калібрувальна крива визначення амлодипіну в плазмі крові.

кількісного визначення відхилення від номінальної концентрації повинно бути не більшим $\pm 20\%$, для калібрувальних розчинів з концентраціями, вищими, ніж нижня межа кількісного визначен-

ня, – не більшим $\pm 15\%$. Калібрувальні розчини, відхилення яких становить понад $\pm 15\%$, слід виключити з розрахунку рівнянь регресії, не змінюючи вихідної моделі.

Regression Equation: $y = 0.388x + 0.0321$ ($r = 0.9993$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
0.5	1	0.50	99.1	NaN	NaN
1	1	1.00	100.0	NaN	NaN
2.5	1	2.66	106.5	NaN	NaN
4	1	3.95	98.7	NaN	NaN
5	1	4.87	97.3	NaN	NaN
25	1	25.64	102.6	NaN	NaN
45	1	44.58	99.1	NaN	NaN
50	1	48.37	96.7	NaN	NaN

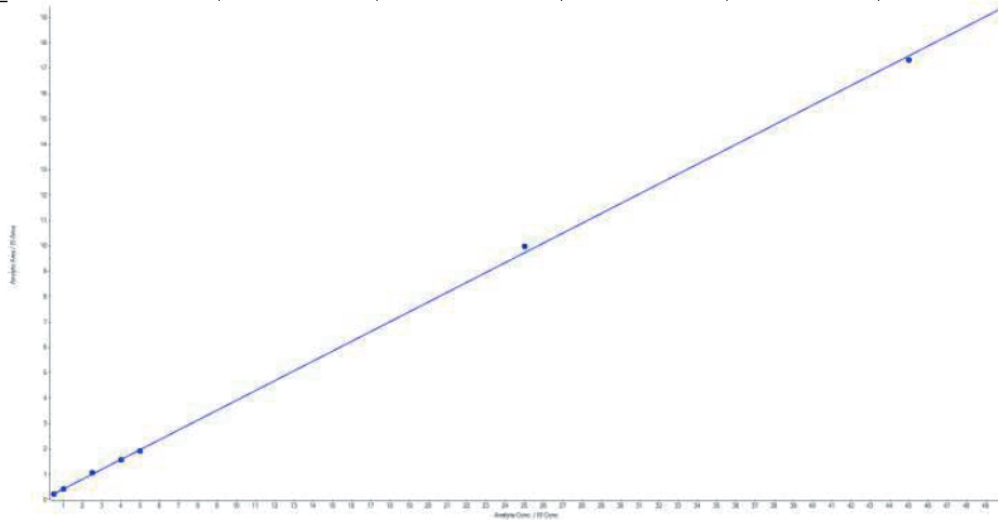


Рис. 2. Калібрувальна крива визначення бісопрололу в плазмі крові.

Regression Equation: $y = 0.00532x + 0.00379$ ($r = 0.9986$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
5	1	5.19	103.9	NaN	NaN
10	1	9.54	95.4	NaN	NaN
25	1	22.89	91.5	NaN	NaN
40	1	39.90	99.8	NaN	NaN
50	1	50.31	100.6	NaN	NaN
250	1	258.81	103.5	NaN	NaN
450	1	454.17	100.9	NaN	NaN
500	1	522.03	104.4	NaN	NaN

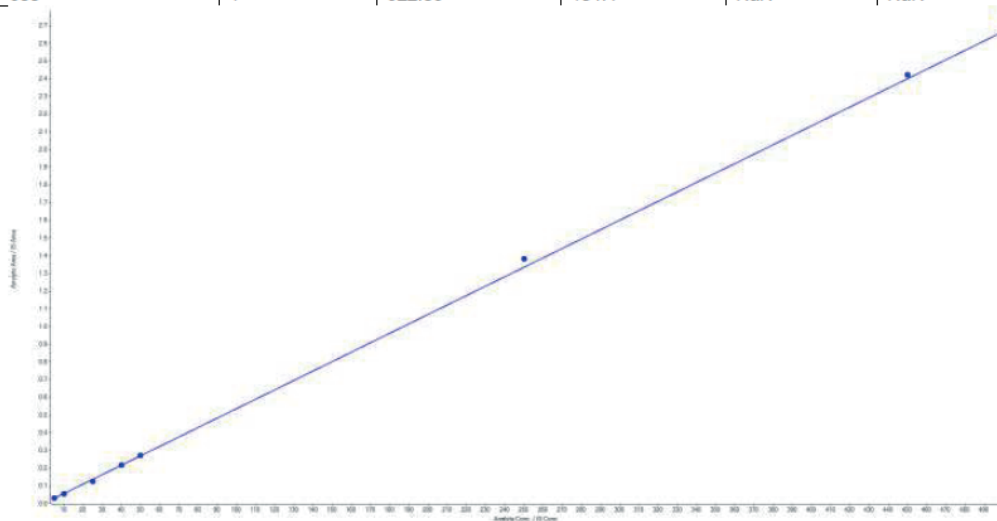


Рис. 3. Калібрувальна крива визначення еналаприлу в плазмі крові.

Regression Equation: $y = 0.0175x + -7.76e-005$ ($r = 0.9967$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
0.1	1	0.10	97.7	NaN	NaN
0.2	1	0.21	102.5	NaN	NaN
0.5	1	0.53	106.4	NaN	NaN
0.8	1	0.87	109.0	NaN	NaN
1	1	0.88	87.7	NaN	NaN
5	1	4.67	93.4	NaN	NaN
9	1	9.02	100.3	NaN	NaN
10	1	10.30	103.0	NaN	NaN

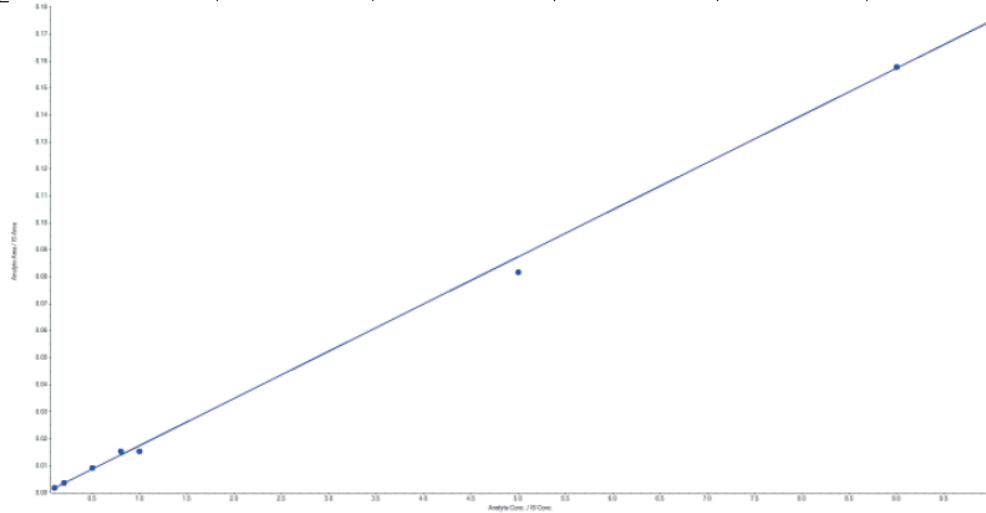


Рис. 4. Калібрувальна крива визначення амлодипіну за умов вивчення фармакокінетики.

Regression Equation: $y = 0.464x + 0.0314$ ($r = 0.9965$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
0.5	1	0.51	101.1	NaN	NaN
1	1	0.98	98.1	NaN	NaN
2.5	1	2.65	106.2	NaN	NaN
4	1	3.71	92.6	NaN	NaN
5	1	4.79	95.8	NaN	NaN
25	1	22.77	91.1	NaN	NaN
45	1	50.68	112.6	NaN	NaN
50	1	51.25	102.5	NaN	NaN

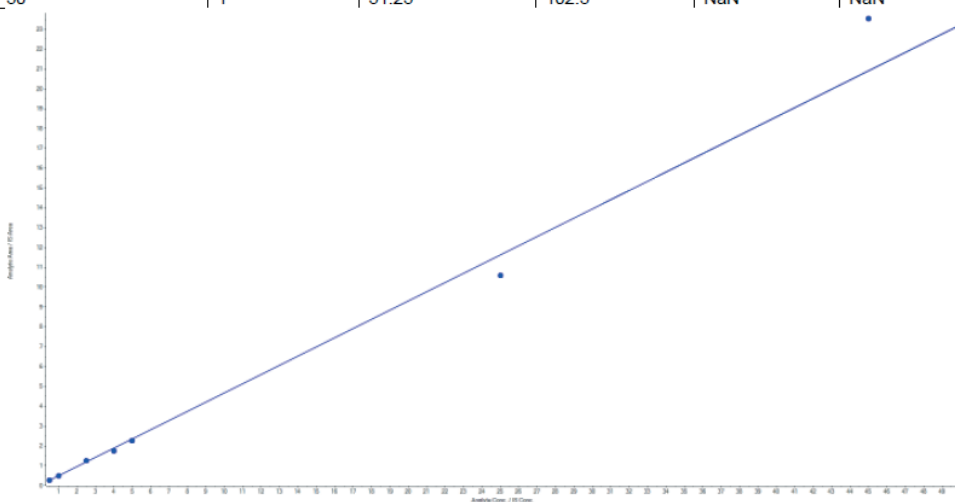


Рис. 5. Калібрувальна крива визначення бісопрололу за умов вивчення фармакокінетики.

Доведено лінійну залежність між концентрацією та площею хроматографічних піків амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу в діапазоні концентрацій 0,1–10 нг/мл, 0,5–50 нг/мл і 5–500 нг/мл відповідно (рис. 1–6).

Висновок щодо розробленої методики по валідаційному параметру “лінійність/калібрувальна модель” – коректна.

Regression Equation: $y = 0.00492x + 0.00218$ ($r = 0.9981$)

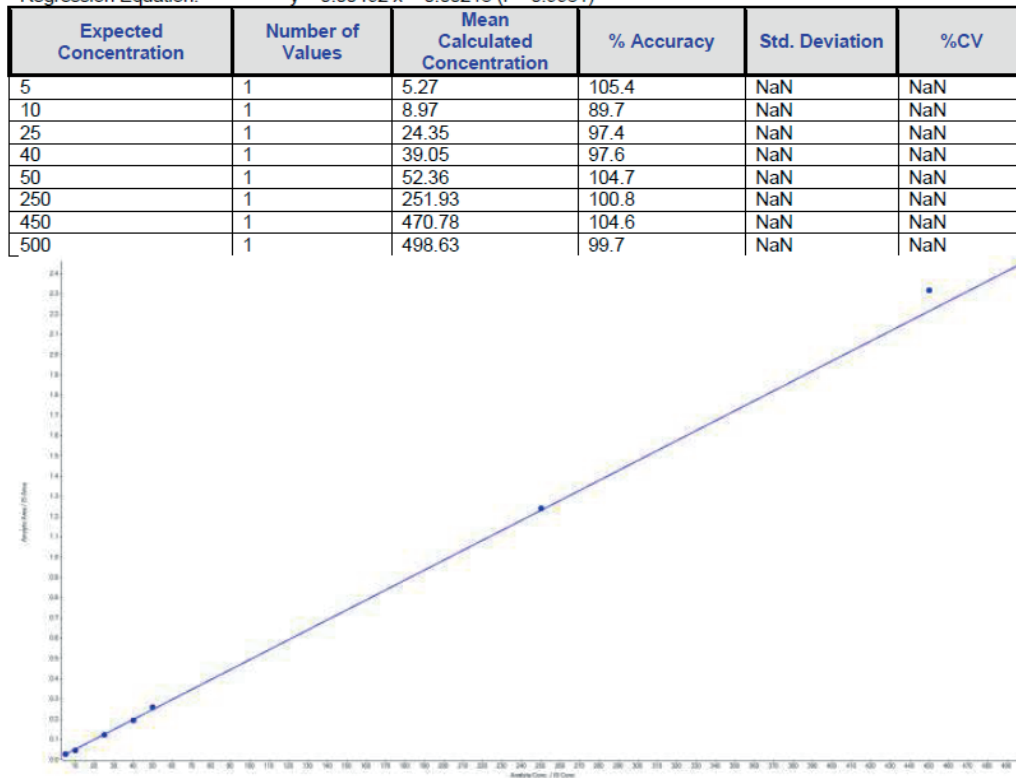


Рис. 6. Калібрувальна крива визначення еналаприлу за умов вивчення фармакокінетики.

ВИСНОВКИ. 1. Проведено експериментальне вивчення валідаційного параметра “лінійність/калібрувальна модель” кількісного визначення амлодипіну, бісопрололу та еналаприлу в плаз-

мі крові для виконання фармакокінетичних досліджень.

2. Висновок щодо розробленої методики по валідаційному параметру “лінійність/калібрувальна модель” – коректна.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A strategy for validation of bioanalytical methods / S. Braggio, R. J. Barnaby, P. Grosi, M. Cugola // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1996. – No. 14 (4). – P. 375–388.
2. Singh U. K. Bioanalytical method development and validation / U. K. Singh, P. Pandey, P. K. Keshri // *Biorg. Chem.* – 2000. – No. 2. – P. 34–45.
3. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion / R. Causon // *J. Chromatogr. B*. 1997. – No. 689 (1). – P. 175–180.
4. Sharma A. Bioanalytical Method development and Validation of Drugs in Biological fluid / A. Sharma, S. Rathore // *Int. J. of Pharm & Research Sci.* – 2012. – No. 1 (4). – P. 216–226.
5. James C. A. Bioanalytical method validation: a risk-based approach / C. A. James, M. Breda, E. Frige-

- rio // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2004. – No. 35 (4). – P. 887–889.
6. Bioanalytical method development and validation by using LC-MS/MS / S. Murugan, N. Pravallika, P. Sirisha, K. Chandrakala // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – No. 6 (1). – P. 41–45.
7. Валидация биоаналитического метода : метод. рек. / ГП “Государственный экспертный центр”. – К., 2013. – 35 с.
8. Logoyda L. The methods for determination of combination antihypertensive drugs in human plasma by HPLC MS/MS / L. Logoyda, D. Korobko, S. Kovalenko. – 23rd Dubai International Pharmaceuticals & Technologies Conference & Exhibition, February 27 – March 01, 2018. Dubai, 2018. – P. 40.

REFERENCES

1. Braggio, S., Barnaby, R.J., Grosi, P., & Cugola, M. (1996). A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14 (4), 375-388.
2. Singh, U.K., Pandey, P., & Keshri, P.K. (2000). Bioanalytical method development and validation. *J. Biorg. Chem.*, 2, 34-45.
3. Causon, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B.*, 689 (1), 175-180.
4. Sharma, A., & Rathore, S. (2012). Bioanalytical method development and validation of drugs in biological fluid. *Int. J. of Pharm & Research Sci.*, 1 (4), 216-226.
5. James, C.A., Breda, M., & Frigerio, E. (2004). Bio-analytical method validation: a risk-based approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (4), 887-889.
6. Murugan, S., Pravallika, N., Sirisha, P., & Chandrakala, K. (2013). Bioanalytical method development and validation by using Lc-Ms/Ms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 6 (1), 41-45.
7. (2013). *Validatsiya bioanaliticheskogo metoda: metod. rekomendatsii [Validation of the bioanalytical method: method. Recommendations]*. Kiev [in Russian].
8. Logoyda, L., Korobko, D., & Kovalenko, S. (2018). The methods for determination of combination antihypertensive drugs in human plasma by HPLC MS/MS. 23rd Dubai International Pharmaceuticals & Technologies Conference & Exhibition, February 27 – March 01, 2018. Dubai.

Л. С. Логойда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАЛИДАЦИОННОГО ПАРАМЕТРА “ЛИНЕЙНОСТЬ/ КАЛИБРОВОЧНАЯ МОДЕЛЬ” АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫХ АНАЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Резюме

Вступление. Для изучения фармакокинетики лекарственных средств чрезвычайно актуальна разработка биоаналитических методик анализа. Однако обычно с целью повышения эффективности фармакотерапии любого заболевания, в том числе гипертонической болезни, пациенту назначают несколько лекарственных средств одновременно или же объектами изучения являются многокомпонентные лекарственные средства, поэтому целесообразно разработать биоаналитическую методику одновременного определения нескольких аналитов (иногда и их метаболитов) в плазме крови.

Цель исследования – провести экспериментальное изучение валидационного параметра “линейность/калибровочная модель” количественного определения амлодипина, бисопролола и эналаприла в плазме крови для выполнения фармакокинетических исследований.

Методы исследования. Биоаналитическая методика определения амлодипина, бисопролола и эналаприла основывается на ВЭЖХ/МС/МС анализе аналитов в исследуемых растворах, полученных из образцов плазмы после предварительного осаждения белков.

Результаты и обсуждение. Доказана линейная зависимость между концентрацией и площадью хроматографических пиков амлодипина, бисопролола и эналаприла в диапазоне концентраций 0,1–10 нг/мл, 0,5–50 нг/мл и 5–500 нг/мл соответственно.

Вывод. Вывод относительно разработанной методики по валидационному параметру “линейность/калибровочная модель” – корректна.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амлодипин; бисопролол; эналаприл; валидация; валидационный параметр “линейность/калибровочная модель”.

PROCEDURE FOR DETERMINING THE VALIDATION PARAMETER “LINEARITY/CALIBRATION MODEL” OF ANALYTICAL METHODOLOGY OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SOME ANTIHYPERTENSIVE ANALYTES IN BIOLOGICAL LIQUIDS FOR PHARMACOKINETIC STUDIES

Summary

Introduction. To study the pharmacokinetics of medicines, the most relevant is the development of bioanalytical methods of analysis. However, in order to increase the effectiveness of the pharmacotherapy of any disease, including hypertension, several medicines are prescribed at the same time, or multicomponent medicines are the subject of study, so it is expedient to develop a bioanalytical method for the simultaneous determination of several analytes, and sometimes in the presence of their metabolites, in the human plasma.

The aim of the study – to conduct an experimental study of validation parameter “linearity/calibration model” for quantitative determination of amlodipine, bisoprolol and enalapril in human plasma for pharmacokinetic studies.

Research Methods. The bioanalytical method for the determination of amlodipine, bisoprolol and enalapril is based on HPLC/MS/MS analysis of analytes in investigated solutions obtained from plasma samples after pre-precipitation of proteins.

Results and Discussion. A linear relationship was found between the concentration and the chromatographic peaks of amlodipine, bisoprolol and enalapril in the range of concentrations of 0.1–10 ng/ml, 0.5–50 ng/ml and 5–500 ng/ml, respectively.

Conclusion. The conclusion regarding the developed methodology according to the validation parameter “linearity/calibration model” is correct.

KEY WORDS: amlodipine, bisoprolol, enalapril, validation, “linearity/calibration model”.

Отримано 05.04.18

Адреса для листування: Л. С. Логойда, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: logoyda@tdmu.edu.ua.