



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики определения помалидомида 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, Н. П. Садчикова²

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

*Корреспондент: 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>; Н. П. Садчикова – <https://orcid.org/0000-0002-3774-5247>.

Статья поступила: 05.10.2020. Статья принята в печать: 10.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В-клеточная неоплазия плазмы клеток является причиной плазмноклеточной миеломы – второго по распространенности злокачественного заболевания системы крови. Помалидомид применяют в качестве терапии плазмноклеточной миеломы в случаях тяжелого течения заболевания и отсутствия эффективности прочих терапий. Помалидомид является структурным аналогом талидомида, он одобрен в России и США в качестве иммуномодулирующего препарата. В настоящее время данные по определению помалидомида в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для исследований фармакокинетики практически отсутствуют, а имеющиеся отличаются по условиям детектирования. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения метанолом.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Определение помалидомида в плазме крови проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков метанолом.

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

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 1,00–500,00 нг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов помалидомида.

Ключевые слова: помалидомид, 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 участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. М. А. Токарева, Н. П. Садчикова, В. В. Давыданова участвовали в написании текста статьи. 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., Садчикова Н. П. Разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154>

Development and Validation of Pomalidomide 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,
Natalia P. Sadchikova²

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>; Natalia P. Sadchikova – <https://orcid.org/0000-0002-3774-5247>.

Received: 05.10.2020. Revised: 10.11.2020. Published: 24.11.2020

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Садчикова Н. П., 2020
© Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P., 2020

Abstract

Introduction. B-cell malignancies of the plasma cell leads to the second most spread hematological malignancy disease, called multiple myeloma. Pomalidomide is used in case of previous multiple myeloma ineffective treatment. Pomalidomide is a thalidomide synthetic derived, approved as immunomodulatory drug by the Food and Drug Administration (FDA). Nowadays, detection of pomalidomide in blood plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) is not spread. Moreover, the detection and the experimental setting accumulated data are varying greatly. This investigation provides development and validation of pomalidomide aiming to determine human blood plasma by HPLC-MS/MS method. The samples were processed by methanol protein precipitation.

Aim. The aim of this study is to develop a method for the pomalidomide in human plasma by HPLC-MS/MS for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of pomalidomide in plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by methanol protein precipitation.

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

Conclusion. The method of the determination of pomalidomide in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The linearity in plasma sample was achieved in the concentration range of 1,00 – 500,00 ng/ml. Method could be applied to pomalidomide determination in plasma for PK and BE studies.

Keywords: pomalidomide, 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 have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor S. Shohin carried out the organization of work in this direction. Margarita A. Tokareva, Natalia P. Sadchikova, Veronika V. Davydanova participated in writing the text of this article. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

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., Sadchikova N. P. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154>

ВВЕДЕНИЕ

Развитие медицины привело к возможности лечения заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми. В последнее время множество исследований проводятся в направлении терапии злокачественных новообразований. В-клеточная неоплазия плазмы клеток является причиной плазмноклеточной миеломы – второго по распространенности злокачественного заболевания системы крови. Для лечения данного заболевания используются препараты, производные талидомида [1].

Помалидомид – иммуномодулятор второго поколения, производное талидомида. Его применяют в качестве терапии плазмноклеточной миеломы в случае развития опухоли и отсутствии эффективности терапии леналидомидом и бортезомибом [2]. Механизм действия препарата заключается в стимулировании работы Т-клеток и природных киллеров, индуцировании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. К тому же было обнаружено комплексное воздействие вещества на плазмноклеточную миелому [3].

Помалидомид – (R,S)-4-Амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион – иммуномодулирующий препарат, одобренный в России и США (рисунок 1) [2].

В литературных данных представлено большое количество методик определения помалидомида в плазме крови различными методами, например: спектрофлуориметрия [2], высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим и ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-ФЛД/УФ) [4], высокоэффективная жидкостная хроматография с

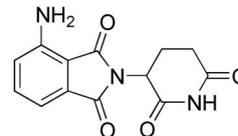


Рисунок 1. Структурная формула помалидомида

Figure 1. Chemical structure of pomalidomide

тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [5], сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [6, 7]. В качестве пробоподготовки используются способы осаждения белков ацетонитрилом [2, 5] и жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) [4, 6, 7]. Данные представлены в таблице 1.

Следует отметить, что разработка простой и эффективной методики определения помалидомида в плазме крови человека является необходимой для будущих исследований биоэквивалентности препарата, поскольку, как показал анализ литературы, в настоящее время данные по определению помалидомида в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС для исследований фармакокинетики практически отсутствуют, а имеющиеся отличаются по условиям детектирования.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения метанолом.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения помалидомида

Table 1. Bioanalytical methods of pomalidomide quantitative determination

| Аналитический метод Analytical method | Объект анализа Object | Пробоподготовка Sample preparation | Источник ионизации и ионизация Ionization source and ionization | Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml | Ссылка Reference |
|---|---|---|--|--|---------------------|
| Спектрофлуориметрия Spectrofluorimetry | Плазма крови человека Human blood plasma | Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile | – | 31,00–500,00 | [2] |
| ВЭЖХ-ФЛД/УФ HPLC-FLD/UV | Плазма крови человека Human blood plasma | ЖЖЭ Liquid-liquid extraction | – | 1,00–500,00 | [4] |
| ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS | Плазма крови мыши Mouse blood plasma | Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile | Химическая ионизация при атмосферном давлении; положительная Atmospheric-pressure chemical ionization; positive | 0,08–819,73 | [5] |
| СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS | Плазма крови мыши Mouse blood plasma | ЖЖЭ Liquid-liquid extraction | Ионизация электроспреем; отрицательная Electrospray ionization; negative | 0,47–400,00 | [6] |
| СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS | Плазма крови человека Human blood plasma | ЖЖЭ Liquid-liquid extraction | Ионизация электроспреем; отрицательная Electrospray ionization; negative | 10,00–1009,65 | [7] |

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 тандемным 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 «UHPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore, США), вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы помалидомида (Sigma Aldrich, количественное содержание 99,5 %) и леналидомида (Sigma Aldrich, количественное содержание 99,0 %).

Исходные стандартные растворы помалидомида и внутреннего стандарта (BC) леналидомида готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

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 300 мкл калибровочного образца, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора BC леналидомида, затем прибавляли 600 мкл метанола, 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 виалы и помещали в автосамплер хроматографа (таблица 2).

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Kinetex™ C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: *Элюент А*: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму); *элюент В*: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.
- Объем вводимой пробы: 10 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–5,00 мин.
- Параметры источника ионизации (химическая ионизация при атмосферном давлении): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 5 л/мин, блок нагрева 300 °С, линия десольватации 200 °С, напряжение на капилляре +5,0 кВ.
- Режим ионизации: положительный.

- Время удерживания помалидомида: около 2,4 мин.
- Время удерживания леналидомида: около 2,1 мин.
- Условия детектирования помалидомида: 274,15 → 84,10 m/z.
- Условия детектирования леналидомида: 260,10 → 149,15 m/z.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. Concentrations of analytes at calibration levels

| Уровень Level | Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml | Концентрация внутреннего стандарта, нг/мл Internal standard concentration, ng/ml |
|------------------|---|--|
| | помалидомид pomalidomide | леналидомид lenalidomide |
| 1 | 1,00 | 3,00 |
| 2 | 3,00 | 3,00 |
| 3 | 10,00 | 3,00 |
| 4 | 25,00 | 3,00 |
| 5 | 50,00 | 3,00 |
| 6 | 100,00 | 3,00 |
| 7 | 250,00 | 3,00 |
| 8 | 400,00 | 3,00 |
| 9 | 500,00 | 3,00 |

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

| Время, мин Time, min | Элюент А, % Eluent A, % | Элюент В, % Eluent B, % | Скорость потока подвижной фазы, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
| 0,00 | 93,00 | 7,00 | 1,00 |
| 1,00 | 93,00 | 7,00 | |
| 2,50 | 0,00 | 100,00 | |
| 3,10 | 0,00 | 100,00 | |
| 3,20 | 93,00 | 7,00 | |
| 5,00 | 93,00 | 7,00 | |

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию исследуемого вещества, при этом эти подходы зачастую противоречили друг другу. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы детектирования, в том числе различные способы ионизации при масс-спектрометрическом детектировании (тройной квадруполь). Так, применение ионизации электроспреем в положительной и отрицательной полярностях не позволило достичь требуемой чувствительности. Применение химической ионизации при атмосферном давлении в режиме отрицательной полярности позволило достичь чувствительности в целом сопоставимой с применением флуориметрического детектирования. При этом масс-селективное детекти-

рование обеспечило гораздо более высокую селективность, а также позволило сократить время анализа за счёт значительно меньшего влияния фоновых компонентов плазмы.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств [8], а также руководств FDA [9] и EMA [10] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- степень извлечения;
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность (стабильность исходных стандартных растворов аналита и ВС; краткосрочная стабильность («настолярная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита 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 помалидомида 1,00 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 исследуемого вещества и ВС, не превышают 20 % от сигнала на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала внутреннего стандарта соответственно (таблица 4). Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 2, 3.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов помалидомида и леналидомида без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме, без учёта влияния степени извлечения помалидомида и леналидомида из биологической матрицы.

Эффект матрицы был оценен на нижнем (L) (таблица 5, № 3) и верхнем (H) уровнях (таблица 5, № 8) аналитического диапазона концентраций помалидомида. Для внутреннего стандарта леналидомида эффект матрицы был рассчитан на уровне 3,00 нг/мл. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 4. Оценка селективности методики определения помалидомида и леналидомида

Table 4. Selectivity assessment of pomalidomide and lenalidomide determination

| | Значение площади Area value | | Отношение площадей, % Area ratio, % | | Селективность Selectivity | |
|--|--------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|---|--|
| | помалидомид pomalidomide | ленолидамид lenolidamide | помалидомид pomalidomide | ленолидамид lenolidamide | критерий приемлемости acceptance criteria | соответствие критерию приемлемости compliance acceptance criteria |
| НПКО интактная плазма Lower limit of quantification, blank plasma | 1015 | 37815 | - | - | Сигнал аналита образца не превышает 20 % от сигнала на уровне НПКО. Сигнал ВС образца не превышает 5 % от сигнала ВС Analyte signal is less than 20 % of the signal at the lower limit of quantitation. Internal standard signal is less than 5 % of sample internal standard signal | - |
| НПКО гемолизная плазма Lower limit of quantification, hemolyzed plasma | 973 | 36213 | - | - | | - |
| НПКО гиперлипидемическая плазма Lower limit of quantification, lipemic plasma | 968 | 36086 | - | - | | - |
| Интактная плазма 1 Blank plasma 1 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма 2 Blank plasma 2 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма 3 Blank plasma 3 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма 4 Blank plasma 4 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма 5 Blank plasma 5 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма 6 Blank plasma 6 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма гиперлипидемическая 1 Lipemic blank plasma 1 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма гиперлипидемическая 2 Lipemic blank plasma 2 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма гемолизная 1 Hemolyzed blank plasma 1 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |
| Интактная плазма гемолизная 2 Hemolyzed blank plasma 2 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | | да yes |

Калибровочная кривая

Проводили анализ девяти образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС леналидомида и рабочего стандартного раствора помалидомида до концентраций, указанных в таблице 2. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика помалидомида к площади пика леналидомида

от отношения концентрации помалидомида к концентрации леналидомида в плазме крови, приведенные на рисунке 4 совместно с уравнением калибровочной кривой и коэффициентами корреляции.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений приведены в таблице 6.

Sample Name : Blank_01
Month-Day Acquired : 05.12.2019
Time Acquired : 18:32:02
Injection Volume : 10
Method File : poma_quant.lcm

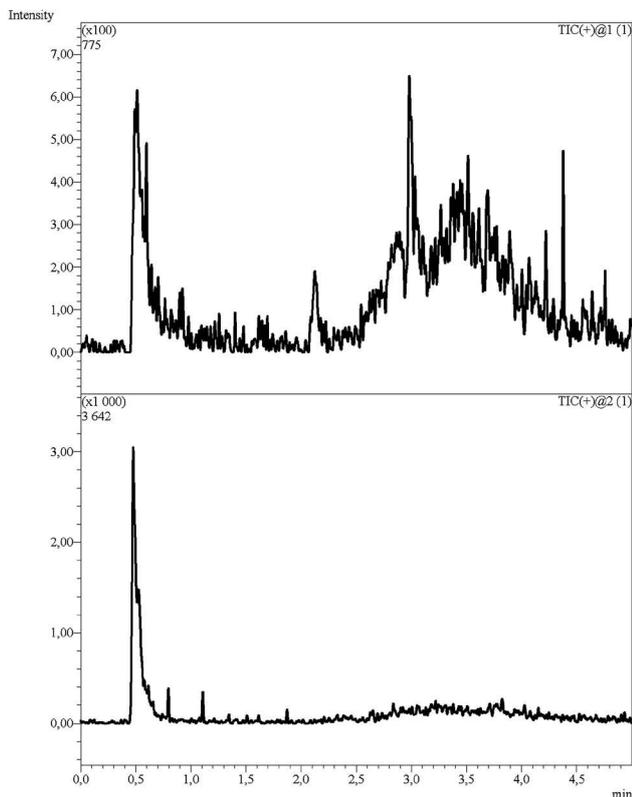


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Blank plasma sample chromatogram

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

Table 5. The matrix factor of pomalidomide calculations, normalized by the internal standards matrix factor

| № | Mf помалидомида на уровне L Mf of pomalidomide, level L | Mf леналидомида Mf lenalidomide | Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L) | Mf помалидомида на уровне H Mf of pomalidomide, level H | Mf леналидомида Mf lenalidomide | Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H) |
|--------------------|--|------------------------------------|---|--|------------------------------------|---|
| 1 | 0,94 | 1,11 | 0,84 | 0,98 | 1,12 | 0,87 |
| 2 | 0,93 | 1,15 | 0,81 | 0,98 | 1,08 | 0,91 |
| 3 | 1,16 | 1,14 | 1,02 | 0,99 | 1,09 | 0,91 |
| 4 | 1,04 | 1,18 | 0,88 | 1,01 | 1,14 | 0,88 |
| 5 | 1,03 | 1,17 | 0,88 | 1,00 | 1,11 | 0,90 |
| 6 | 0,95 | 1,20 | 0,79 | 0,99 | 1,14 | 0,86 |
| Среднее Average | | | 0,87 | Среднее Average | | 0,89 |
| CV, % | | | 9,22 | CV, % | | 2,15 |

Sample Name : QC_1_LLOQ_03
Month-Day Acquired : 05.12.2019
Time Acquired : 21:03:46
Injection Volume : 10
Method File : poma_quant.lcm

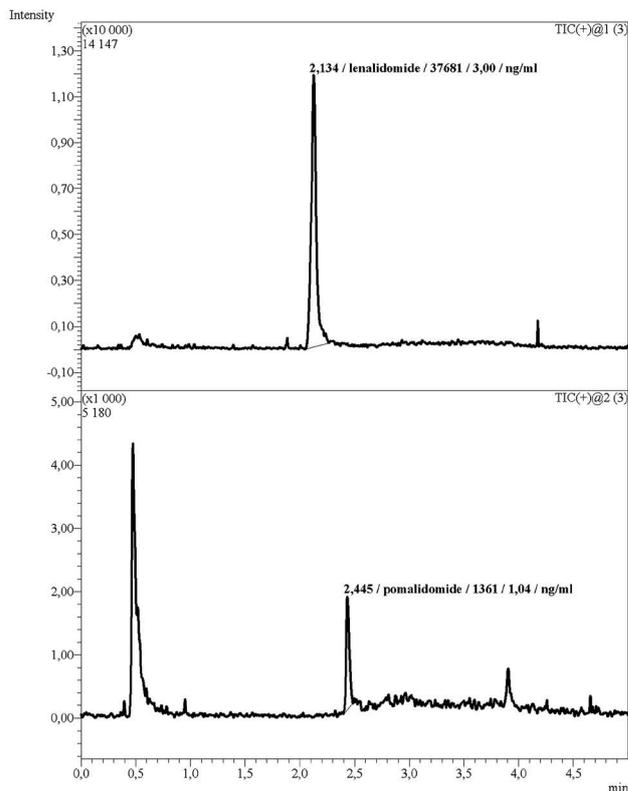


Рисунок 3. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень № 1 (таблица 2)

Figure 3. Chromatogram of plasma sample level № 1 (table 2)

Batch : C:\LabSolutions\Data\pomalidomide\val\val.lcb
Name : pomalidomide
Quantitative Method : Internal Standard
Function : f(x)=0,0290879*x+0,0260614
Rr1=0,9965077 Rr2=0,9930276
FitType : Linear

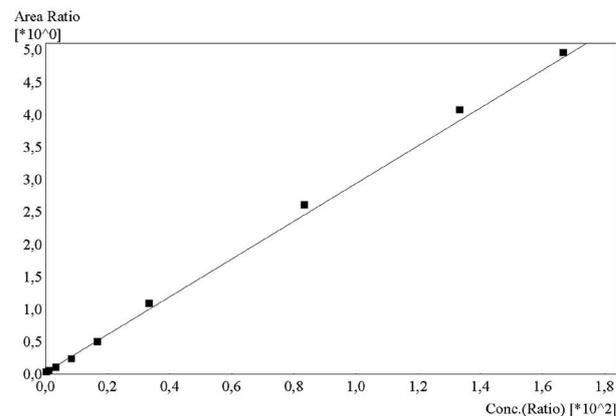


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика помалидомида к площади пика леналидомида от отношения концентрации помалидомида к концентрации леналидомида в плазме крови

Figure 4. The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of pomalidomide to the lenalidomide on the concentration ratio of pomalidomide to the lenalidomide in plasma

Таблица 6. Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений

Table 6. Analyte samples concentrations deviations from their nominal calibration parameters

| № | Концентрация помалидомида номинальная, нг/мл Nominal pomalidomide concentration, ng/ml | Концентрация леналидомида рассчитанная, нг/мл Measured lenalidomide concentration, ng/ml | E, % | Норма, не более, % Rate, no more, % |
|---|---|---|--------|--|
| 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 20,00 |
| 2 | 3,00 | 3,11 | 3,67 | 15,00 |
| 3 | 10,00 | 8,72 | -12,80 | 15,00 |
| 4 | 25,00 | 22,00 | -12,00 | 15,00 |
| 5 | 50,00 | 49,10 | -1,80 | 15,00 |
| 6 | 100,00 | 110,00 | 10,00 | 15,00 |
| 7 | 250,00 | 266,25 | 6,50 | 15,00 |
| 8 | 400,00 | 417,56 | 4,39 | 15,00 |
| 9 | 500,00 | 508,63 | 1,73 | 15,00 |

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням: НПКО, низкий уровень (L) (таблица 2, № 3), средний уровень (M) (таблица 2, № 7), верхний уровень (H) (таблица 2, № 8). Анализ образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность 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 7.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относитель-

ной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы без влияния степени извлечения, на низком, среднем и высоком уровнях, 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.

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

Table 8. Calculation of pomalidomide spike recovery at L, M, H levels for biological matrix

| | Степень извлечения помалидомида на уровне L, % Recovery, level L | Степень извлечения помалидомида на уровне M, % Recovery, level M | Степень извлечения помалидомида на уровне H, % Recovery, level H |
|--|---|---|---|
| Плазма крови Plasma | 101,46 | 42,80 | 100,96 |
| | 86,22 | 39,15 | 95,48 |
| | 100,03 | 41,87 | 102,95 |
| Плазма, полученная из крови, подвергшейся гемолизу Hemolyzed plasma | 113,28 | 37,11 | 108,49 |
| | 124,50 | 34,95 | 116,51 |
| | 116,05 | 35,14 | 112,31 |
| Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic plasma | 104,71 | 35,86 | 117,43 |
| | 108,40 | 33,15 | 128,15 |
| | 103,27 | 34,24 | 121,51 |
| Среднее Mean | 106,44 | 37,14 | 111,53 |
| SD, % | 10,94 | 3,41 | 10,54 |
| RSD, % | 10,28 | 9,19 | 9,45 |

Таблица 7. Точность и прецизионность методики

Table 7. Accuracy and precision of the method

| Введено (нг/мл) Spiked (ng/ml) | Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean | | | 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>помалидомид pomalidomide</i> | | | | | | | | | | | | |
| 1,00 | 0,99 | 1,00 | 0,99 | 0,04 | 0,07 | 0,10 | 4,20 | 6,96 | 10,55 | -1,20 | -0,40 | -1,20 |
| 3,00 | 2,88 | 2,96 | 2,97 | 0,31 | 0,33 | 0,26 | 10,72 | 11,09 | 8,85 | -4,00 | -1,50 | -0,89 |
| 250,00 | 277,01 | 274,51 | 276,54 | 6,85 | 7,66 | 12,61 | 2,47 | 2,79 | 4,56 | 10,80 | 9,80 | 10,62 |
| 400,00 | 431,99 | 437,34 | 441,74 | 8,73 | 11,80 | 22,25 | 2,02 | 2,70 | 5,04 | 8,00 | 9,33 | 10,43 |

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, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация помалидомида в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение помалидомида со значениями RSD и E не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1,00 нг/мл. Отношение сигнал/шум по пику помалидомида на уровне НПКО составляет 14,78. Предел обнаружения помалидомида для данной методики составил около 0,20 нг/мл (отношение сигнал/шум 3,00).

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («настоящая» и «постпрепаративная»), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность стандартных растворов (при хранении в течение 62 дней при температуре –45 °С), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 62 дней при температуре –45 °С) 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 исследуемого вещества и ВС. Хроматограмма образца на уровне ВПКО представлена на рисунке 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составили 1,00–500,00 нг/мл помалидомида в плазме крови человека. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов помалидомида.

Sample Name : Cal 1 9
Month-Day-Acquired : 05/12/2019
Time Acquired : 20:41:21
Sample Type : Standard
Injection Volume : 10
Method File : poma_quant.lcm

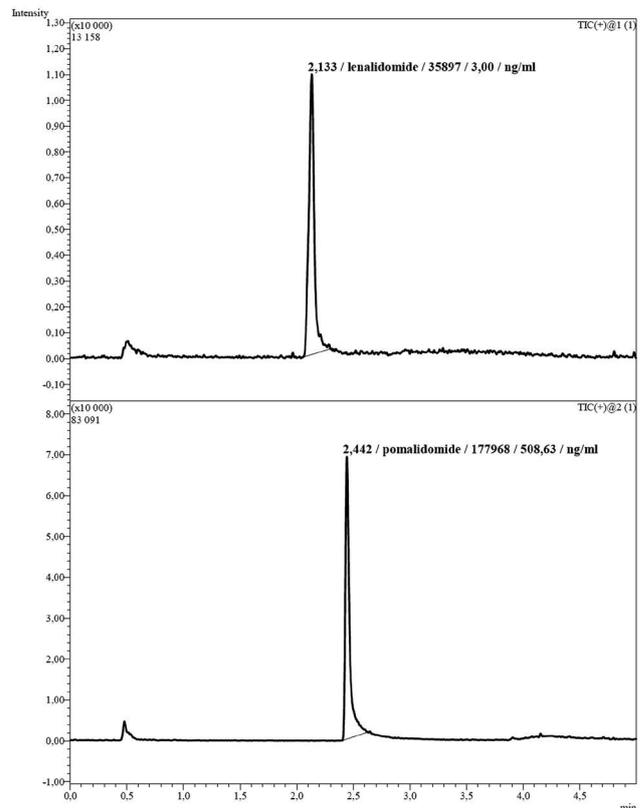


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень № 9 (таблица 2)

Figure 5. Chromatogram of plasma sample level № 9 (table 2)

ЛИТЕРАТУРА

- Neşetoglu N., Kaplan C., Aslan S. S., Ünal D. Ö. A Simple and Rapid LC-MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Lenalidomide. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2020;21(1):19–26. DOI: 10.21743/pjaec/2020.06.03.
- Aydoğmuş Z., Yılmaz E. M., Yildiz G. A simple and rapid spectrofluorometric determination of pomalidomide in spiked plasma and urine. Application to degradation studies. *Luminescence*. 2019;35(4):1–12. DOI: 10.1002/bio.3748.
- Hoffmann M., Kasserra C., Reyes J., Schafer P., Kosek I., Capone L., Parton A., Kim-Kang H., Surapaneni S., Kumar G. Absorption, metabolism and excretion of [14C]pomalidomide in humans following oral administration. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013;71(2):489–501. DOI: 10.1007/s00280-012-2040-6.
- Shahbazi S., Peer C. J., Polizzotto M. N., Uldrick T. S., Roth J., Wyvill K. M., Aleman K., Zeldis J. B., Yarchoan R., Figg W. D. A sensitive and robust HPLC assay with fluorescence detection for the quantification of pomalidomide in human plasma for pharmacokinetic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;92:63–68. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.01.001.
- Jiang Y., Wang J., Rozewski D. M., Kolli S., Wu C., Chen C., Yang X., Hofmeister C. C., Byud J. C., Johnson A. J. Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry methods for quantification of pomalidomide in mouse plasma and brain tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;88:26–268. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.036.

- Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K. A., Shakeel F. A validated UPLC–MS/MS assay using negative ionization mode for high-throughput determination of pomalidomide in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015;983-984:76–82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.036.
- Vasanth D. A., Rajkamal B. A UPLC-MS/MS method development and validation for the estimation of pomalidomide from human plasma. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(1):37–43. DOI: 10.22159/ijap.2017v9i1.15653.
- Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К, 2013. 280 с.
- 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>.
- Shahbazi S., Peer C. J., Polizzotto M. N., Uldrick T. S., Roth J., Wyvill K. M., Aleman K., Zeldis J. B., Yarchoan R., Figg W. D. A sensitive and robust HPLC assay with fluorescence detection for the quantification of pomalidomide in human plasma for pharmacokinetic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;92:63–68. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.01.001.
- Jiang Y., Wang J., Rozewski D. M., Kolli S., Wu C., Chen C., Yang X., Hofmeister C. C., Byud J. C., Johnson A. J. Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry methods for quantification of pomalidomide in mouse plasma and brain tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;88:26–268. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.036.
- Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K. A., Shakeel F. A validated UPLC–MS/MS assay using negative ionization mode for high-throughput determination of pomalidomide in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015;983-984:76–82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.036.
- Vasanth D. A., Rajkamal B. A UPLC-MS/MS method development and validation for the estimation of pomalidomide from human plasma. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(1):37–43. DOI: 10.22159/ijap.2017v9i1.15653.
- Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. Moscow: *Grif and K*, 2013. 280 p. (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>.

REFERENCES

- Neşetoglu N., Kaplan C., Aslan S. S., Ünal D. Ö. A Simple and Rapid LC-MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Lenalidomide. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2020;21(1):19–26. DOI: 10.21743/pjaec/2020.06.03.
- Aydoğmuş Z., Yılmaz E. M., Yildiz G. A simple and rapid spectrophotometric determination of pomalidomide in spiked plasma and urine. Application to degradation studies. *Luminescence*. 2019;35(4):1–12. DOI: 10.1002/bio.3748.
- Hoffmann M., Kasserra C., Reyes J., Schafer P., Kosek I., Capone L., Parton A., Kim-Kang H., Surapaneni S., Kumar G. Absorption, metabolism and excretion of [¹⁴C]pomalidomide in humans following oral administration. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013;71(2):489–501. DOI: 10.1007/s00280-012-2040-6.
- Shahbazi S., Peer C. J., Polizzotto M. N., Uldrick T. S., Roth J., Wyvill K. M., Aleman K., Zeldis J. B., Yarchoan R., Figg W. D. A sensitive and robust HPLC assay with fluorescence detection for the quantification of pomalidomide in human plasma for pharmacokinetic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;92:63–68. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.01.001.
- Jiang Y., Wang J., Rozewski D. M., Kolli S., Wu C., Chen C., Yang X., Hofmeister C. C., Byud J. C., Johnson A. J. Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry methods for quantification of pomalidomide in mouse plasma and brain tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;88:26–268. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.036.
- Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K. A., Shakeel F. A validated UPLC–MS/MS assay using negative ionization mode for high-throughput determination of pomalidomide in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015;983-984:76–82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.036.
- Vasanth D. A., Rajkamal B. A UPLC-MS/MS method development and validation for the estimation of pomalidomide from human plasma. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(1):37–43. DOI: 10.22159/ijap.2017v9i1.15653.
- Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. Moscow: *Grif and K*, 2013. 280 p. (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>.