



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация определения элтромбопага в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС

А. М. Аль-Дураиби^{1,2}✉, А. Л. Куликов², М. В. Покровский²

¹ Кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Аденский университет, Аден, Йемен

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). Научно-исследовательский институт фармакологии живых систем, лаборатория фармакокинетических исследований. 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85, корпус 11

✉ Контактное лицо: Аль-Дураиби Абдулла Мохаммед. E-mail: aldhuraibi2019@gmail.com

ORCID: А. М. Аль-Дураиби – <https://orcid.org/0000-0002-9044-243X>; А. Л. Куликов – <https://orcid.org/0000-0001-6422-0377>; М. В. Покровский – <https://orcid.org/0000-0002-1493-3376>.

Статья поступила: 18.01.2022

Статья принята в печать: 15.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

Резюме

Введение. «Элтромбопаг» – агонист рецепторов тромбopoэтина (TPO-RAs), одобренный для лечения иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ИТП). В соответствии с изученной литературой, было обнаружено, что существует очень мало аналитических методов для определения элтромбопага в биологических образцах. Для изучения фармакокинетики новых составов элтромбопага необходим чувствительный и специфичный метод, позволяющий точно определять концентрации элтромбопага в плазме крови человека. Обычно методы ВЭЖХ должны обеспечивать время, точность и чувствительность. Поэтому необходимо разработать быстрые или сверхбыстрые методы, такие как LC-MS/MS, без какой-либо потери эффективности и чувствительности разделения.

Цель. Наша цель заключалась в разработке и валидации метода, нацеленное на количественное определение элтромбопага в человеческой плазме крови при том, чтобы использовались методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) для выполнения аналитической части фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количество элтромбопага в плазме человека определяли с помощью ВЭЖХ-МС. Способ осаждения белков был проведен в качестве пробоподготовки.

Результаты и обсуждение. Разработанную методику валидировали по линейности, переносу пробы, стабильности, селективности, точности, эффекту матрицы, прецизионности, пределу количественного определения препарата.

Заключение. Метод определения элтромбопага в плазме крови человека был разработан и валидирован методом ВЭЖХ-МС. При исследовании аналитического диапазона препарат элтромбопаг в плазме составил 10–6750 нг/мл. Данный аналитический диапазон разработанной методики может быть применен для проведения аналитической части фармакокинетических исследований препаратов, содержащих в составе элтромбопаг.

Ключевые слова: «Элтромбопаг», плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, биоэквивалентность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. М. Аль-Дураиби, А. Л. Куликов участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики и проводили статистическую обработку данных. М. В. Покровский отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Аль-Дураиби А. М., Куликов А. Л., Покровский М. В. Разработка и валидация определения элтромбопага в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4):226–239. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-226-239>

Development and Validation of Eltrombopag Determination in Human Plasma Blood by HPLC-MS Method

Abdullah M. AL-Dhuraibi^{1,2}✉, Alexandr L. Kulikov², Mikhail V. Pokrovskiy²

¹ Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Aden University, Aden, Yemen

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University». Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Laboratory of Pharmacokinetic Research. 85/11, Pobeda str., Belgorod, 308015, Russia

✉ Corresponding author: Abdullah. M. AL-Dhuraibi. E-mail: aldhuraibi2019@gmail.com

ORCID: Abdullah M. AL-Dhuraibi – <https://orcid.org/0000-0002-9044-243X>; Alexandr L. Kulikov – <https://orcid.org/0000-0001-6422-0377>; Mikhail V. Pokrovskiy – <https://orcid.org/0000-0002-1493-3376>.

Received: 18.01.2022

Revised: 15.09.2022

Published: 25.11.2022

Abstract

Introduction. "Eltrombopag" is a thrombopoietin receptor agonist (TPO-RA) that is approved for the treatment of immune thrombocytopenic purpura (ITP). According to the literature, very few analytical methods for determining eltrombopag in biological samples have been reported. To study the pharmacokinetics of new formulations of eltrombopag, a sensitive and specific method is required that allows one to accurately determine the concentration of eltrombopag in human blood plasma. Normally, HPLC methods should provide time, accuracy, and sensitivity as a result, it is necessary to develop fast or ultra-fast methods such as LC-MS/MS without any loss in sensitivity or separation efficiency.

© Аль-Дураиби А. М., Куликов А. Л., Покровский М. В., 2022

© AL-Dhuraibi A. M., Kulikov A. L., Pokrovskiy M. V., 2022

Aim. We aimed to develop and validate a method for the quantitative determination of eltrombopag levels in human plasma by using HPLC with mass spectrometric detection for performing the analytical part of pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Eltrombopag levels were determined in human plasma by HPLC with mass spectrometric detection. The samples were prepared using protein deposition.

Results and discussion. The method was validated for selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, the limit of quantification, carry-over effect, and sample stability.

Conclusion. The method for the determination of eltrombopag levels in human plasma has been developed and validated by HPLC-MS. The analytical range of eltrombopag levels in human plasma was 10–6750 ng/ml. This method could be used to determine eltrombopag levels in plasma for PK and BE studies.

Keywords: "Eltrombopag", plasma, HPLC-MS/MS, validation, bioequivalence

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Abdullah M. AL-Dhuraibi, Alexandr L. Kulikov have developed and validated an analytical method and carried out statistical processing of the obtained results. Mikhail V. Pokrovskiy 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: AL-Dhuraibi A. M., Kulikov A. L., Pokrovskiy M. V. Development and validation of eltrombopag determination in human plasma blood by HPLC-MS method. *Drug development & registration*. 2022;11(4):226–239. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-226-239>

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) представляет собой заболевание, при котором иммунная система атакует тромбоциты и вызывает снижение их количества, подвергая пациента риску кровотечения. Диагноз ставится методом исключения [1]. Эльтромбопаг является пероральным биодоступным агонистом рецептора тромбопоэтина (ТПО-РА), одобренным для лечения иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ИТП). Текущие показания к применению эльтромбопага включают лечение гепатита С и тяжелой апластической анемии [2–4] (рисунок 1). Обычная начальная доза составляет 25 мг в день, а поддерживающая доза составляет 75 мг в день [1].

Препарат имеет высокое сродство к связыванию с белками плазмы и преимущественно выводится путем метаболизма в печени и желудочно-кишечном тракте [5]. Согласно литературным данным, существует очень мало аналитических методов для определения эльтромбопага в биологических образцах, включая жидкостную хроматографию, методов масс-спектрометрии [6, 7] и методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [8]. Например, был разработан простой метод ВЭЖХ для определения концентрации эльтромбопага в сыворотке с использованием обычной колонки с октадецилсилил силикагелем (ODS), изократной элюцией и УФ-детектированием [4]. Оламин в фармацевтической лекарственной форме с использованием ОФ-ВЭЖХ, метода сверхэф-

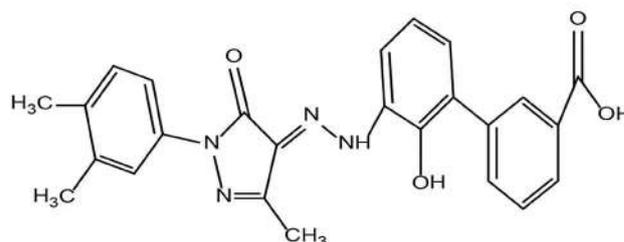


Рисунок 1. Структурная формула «Эльтромбопаг»

Figure 1. Chemical structure of "Eltrombopag"

фективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-УЭЖХ) или нового гибкого, совместимого по массе изократического метода, показывающего стабильность, разработанного с использованием сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) для оценки эльтромбопага вместе с его примесями в составе таблеток [9–11]. Количественное определение эльтромбопага в плазме человека остается сложной задачей из-за его физико-химических свойств и полярности. Для изучения фармакокинетики новых лекарственных форм эльтромбопага необходим чувствительный и специфический метод для точного определения концентрации эльтромбопага в плазме крови человека. Как правило, методы ВЭЖХ требуют затрат времени, возникают погрешности в разрешении или чувствительности. Следовательно,

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения элтромбопага

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of Eltrombopag levels

Аналитический метод Analytical method	Пробоподготовка Sample preparation	Объект анализа Object	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml	Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	Плазма крови человека Human blood plasma	10–2500	[12]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	Плазма крови человека Human blood plasma	50–10007	[8]

необходимо разработать быстрые или сверхбыстрые методы, такие как ЖХ-МС/МС, без потери эффективности и чувствительности разделения. Таким образом, целью данного исследования была разработка простого, быстрого и чувствительного метода ЖХ-МС/МС для определения элтромбопага в плазме крови человека (таблицы 1, 2).

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

Уровень Level	Концентрация аналита «Элтромбопаг», нг/мл Analyte concentration "Eltrombopag", ng/ml	Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
1	10	748
2	30	748
3	337	748
4	1012	748
5	1350	748
6	1687	748
7	5061	748
8	6748	748
LLOQ	10	748
L	30	748
M	4049	748
H	6750	748

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

- Центрифуга лабораторная, многоканальная Centrifuge 5430R (Eppendorf, Германия, аттестована до 25.02.2020).
- Лабораторный встряхиватель ThermoMixer C (Eppendorf, Германия).
- Весы электронные PA 213C (OHAUS Corporation, США, свидетельство о поверке действует до 25.02.2021).
- Жидкостный хроматограф UltiMate 3000 RS LC (Thermo Fisher Scientific, США) с масс-селективным детектором Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, США, свидетельство о поверке действует до 06.02.2020).
- Колонка хроматографическая 2,1 × 150 мм, ZORBAX Eclipse Plus, 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. № 959757-902).
- Ультразвуковая баня с мощностью излучателя 3 Вт.

Реактивы и растворы

- Аммиак (25 %) (PanReac, Испания, каталожный № 141129).
- Уксусная (ледяная) кислота для ВЭЖХ (PanReac, Испания, каталожный № 361008.1611).
- Ацетонитрил (Gradient Grade, Merck KGaA, Германия, каталожный номер 100030.2500).
- Метанол (hypergrade for LC-MS LiChrosolv®, Merck Millipore, США, каталожный № 106035).

1. Стандартные образцы

- Стандартный образец элтромбопага моноэтанолamina Э10619 (годен до 06.21).
- Активная фармацевтическая субстанция, пошедшая на приготовление растворов контроля качества, партия 010719.
- Внутренний стандарт USP RS lot G0K135 (valid in use day) глимепирид: 1-[[4-[2-(3-этил-4-метил-2-оксо-3-пирролин-1-карбоксамидо)-этил]фенил]сульфонил]-3-транс-(4-метилциклогексил)мочевина, брутто-формула: C₂₄H₃₄N₄O₅S и молекулярная масса: 490,6 г/моль CAS: 93479-97-1.

2. Биологическая матрица

- Плазма крови от 6 индивидуальных источников.

Условия проведения и приготовление растворов

Приготовление растворов

Во время отбора проб и последующего измерения параметров все имеющиеся растворы были 18–20 °С (в соответствии с ГФ XIII, XIV изд). Измерение определений каждого из параметров проводилось при постоянных условиях. Все растворы приготовлены в соответствии с биоаналитической методикой (таблицы 3, 4). Используемые реактивы для приготовления:

- Раствор внутреннего стандарта $m = 12,63$ мг.
- Исходный раствор 1 для приготовления градуировочной растворов: навеска элтромбопага моноэтанолamina (точная навеска) $m = 14,40$ мг (в пересчете на элтромбопаг $m = 12,65$ мг).
- Растворы для стандартов качества (К) $m = 14,40$ мг (в пересчете на элтромбопаг $m = 12,65$ мг). Используемое оборудование представлено в разделе 2.4. Процедуры по подготовке и хроматографические условия соответствовали биоаналитической методике (таблицы 3, 4).

Таблица 3. Аликвота исходных растворов, добавляемая в к

Table 3. An aliquot of stock solutions was added to C

№ исходного раствора №. of original solution	№ k № C							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Аликвота исходного раствора 3, мл Aliquot of stock solution 3, ml	0,015	0,045	–	–	–	–	–	–
Аликвота исходного раствора 2, мл Aliquot of stock solution 2, ml	–	–	0,01	0,03	0,04	0,05	0,15	0,2
¹ C _{элтр} в р-ре, нг/мл ¹ C _{eltr} in solution, ng/ml	3	9	101	303	405	506	1518	2024
² C _{элтр} в пересчете на 1 мл плазмы, нг/мл ² C _{eltr} in terms of 1 ml of plasma, ng/ml	10	30	337	1012	1350	1687	5061	6750

Примечание. ¹ Количество ЭЛТР в финальном растворе.

² Количество ЭЛТР в пересчете на 1 мл плазмы крови.

Note. ¹ Quantity of ELTR in the final solution.

² The amount of ELTR in terms of 1 ml of blood plasma.

Таблица 4. Аликвота исходных растворов, добавляемая в КК

Table 4. An aliquot of stock solutions was added to QC

№ исходного раствора №. of original solution	№ КК QC			
	ПКО LLOQ	НKK L	СКК M	ВК H
Аликвота исходного раствора 3, мл Aliquot of stock solution 3, ml	0,015	0,045	–	–
Аликвота исходного раствора 2, мл Aliquot of stock solution 2, ml	–	–	0,12	0,2
¹ Сэлтр, в р-ре, нг/мл ¹ C eltr, in solution, ng/ml	3	9	1215	2024
² Сэлтр, в пересчете на 1 мл плазмы, нг/мл ² Celtr, in terms of 1 ml of plasma, ng/ml	10	30	4049	6750

Примечание. ¹ Количество ЭЛТР в финальном растворе.

² Количество ЭЛТР в пересчете на 1 мл плазме крови.

Note. ¹ Quantity of ELTR in the final solution.

² The amount of ELTR in terms of 1 ml of blood plasma.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Подготовка оборудования. В начале работы был включен жидкостной хроматограф, затем осуществлена выдержка 30 минут для того, чтобы параметры работы стабилизировались. Далее была подключена стальная хроматографическая колонка размером 2,1 × 50 мм, которая была заполнена обращено-фазовым сорбентом октадецилсиликагель с размером частиц 1,8 мкм (например, ZORBAX Eclipse Plus, 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм кат. № 959757-902). Далее установлена температура термостата колонок 30 ± 5 °С, а также задана насосной системе скорость потока 0,4 мл/мин. При этом режим разделения градиентный, состоящий из двух этапов (основное элюирование и промывка) по следующей схеме (таблица 5).

Таблица 5. Градиентное элюирование

Table 5. Gradient elution

Время, мин Time, min	Скорость потока ПФ, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min	0,03%-я уксусная кислота, % об 0.03 % acetic acid, % vol	Ацетонитрил, % об Acetonitrile, % vol	Наименование этапа Stage name
0	0,4	40	60	Основное элюирование Main elution
3,0	0,4	25	75	
3,1	0,6	10	90	Промывка, уравновешивание Flushing, equilibration
4,5	0,6	10	90	
4,6	0,4	40	60	
5,5	0,4	40	60	

Было указано 5,0 мкл автоматической системе ввода образца. Время хроматографирования одного цикла – 5,5 мин.

Ориентировочные времена удерживания:

- внутренний стандарт – около 1,0 мин;
- элтромбопаг – около 2,8 мин.

Все работы с масс-селективным детектором проводились в строгом соответствии с инструкцией по эксплуатации и СОП. Затем был выключен режим «Stand by», выдерживая 15 минут для стабилизации базовой линии, и установлены следующие параметры, показанные в таблице 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Настоящая работа посвящена исследованию валидационных характеристик разработанной биоаналитической методики количественного определения концентрации элтромбопага в биологической матрице (плазмы крови человека).

Таблица 6. Параметры

Table 6. Parameters

Тип ионизации Ionization type	ESI, SRM «+», режим ионизации CID для элтромбопага ESI, SRM «+», режим ионизации CID для внутреннего стандарта ESI, SRM «+», CID ionization mode for eltrombopag ESI, SRM «+», CID ionization mode for internal standard
Переход масс Mass transition	ЭЛТР 443,22 → 322,7; IS 491,60 → 452,1 Eltrombopag 443.22 → 322.7; IS 491.60 → 452.1
Температура источника Source temperature	380 °C
Температура капилляра Capillary temperature	400 °C
Напряжение на источнике Source voltage	3000 В (ЭЛТР), 3000 В (IS) 3000 V (Eltr), 3000 V (IS)
Энергия соударения (CE) Impact energy	ЭЛТР – 30 IS – 35 Eltr – 30 IS – 35
Газ соударений Collision gas	Гелий Helium
Поток Sheath газа Flow Sheath gas	60
Поток Aux газа Aux gas flow	20
Поток Sweep газа Sweep gas flow	1
Остальные параметры в соответствии с автоматической оптимизацией прибора. Other parameters according to the automatic optimization of the device.	

В современной практике клинических исследований существует огромное количество биоаналитических методик для определения. В основе 95 % публично опубликованных методик лежит метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различной детекцией. В исследованиях высокого уровня, связанных с клиническими испытаниями, как правило, используется tandemное масс-спектрометрическое детектирование (МС/МС). Это является «золотым стандартом» для получения достоверных, надежных и точных результатов. ВЭЖХ-МС/МС, как метод очень зависим от ряда факторов. Например таких, как используемый тип ионизации, условия и температурные режимы, состав и качество подвижных, стационарных фаз и других ключевых характеристик. Сложность всех основных процессов, а особенно процессов МС/МС детекции настолько высока, что приемлемая воспроизводимость условий на приборах одинаковых типов, но разных производителей крайне затруднена. Это обусловлено разностью реализации фундаментального физико – химического закона, лежащего в основе определения.

В связи с этим, необходимость разработки биоаналитических методик, применительно к конкрет-

ному комплексу оборудования, конкретной матрице, конкретному диапазону определений является актуальной задачей. Если рассматривать такие задачи через призму регуляторных норм, становится очевидным, что валидация это неотъемлемая часть любой разработки.

Таким образом, целью работы являлось подтверждение на основании лабораторных исследований надежности метода для определения концентрации элтромбопага в биологической матрице для получения достоверного результата, а предметом валидации – биоаналитическая методика определения концентрации элтромбопага в биологической матрице.

Валидация методики

Валидация методики исследования, направленного на препарат Элтромбопаг проводилась соответственно нормам GLP, рекомендациям руководства по экспертизе лекарственных средств (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (2013 г.) [13], Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, FDA 05.2018¹. Guideline on validation of bioanalytical methods. European Medicines Agency Committee for medicinal products for human use². Валидация методики включает показатели:

- селективности;
- эффекта матрицы;
- линейности / калибровочной кривой;
- правильности (на уровнях inter-day и intra-day);
- точность и прецизионность (на уровнях inter-day и intra-day);
- нижнего предела количественного определения;
- кросс-переноса (carryover);
- стабильности основного раствора элтромбопага и внутреннего стандарта,
- стабильности препарата элтромбопаг в плазме в условиях обработки и в течение всего периода хранения (постпрепаративная стабильность; кратковременная температурная стабильность; стабильность после замораживания/оттаивания; долгосрочная температурная стабильность);
- степени извлечения.

Селективность

Селективность биоаналитической методики была изучена на 6 образцах холостой матрицы от 6 индивидуальных источников. Для этого готовили и анализировали испытуемые растворы холостой мат-

¹ Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 25.02.2021.

² Bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 25.02.2021.

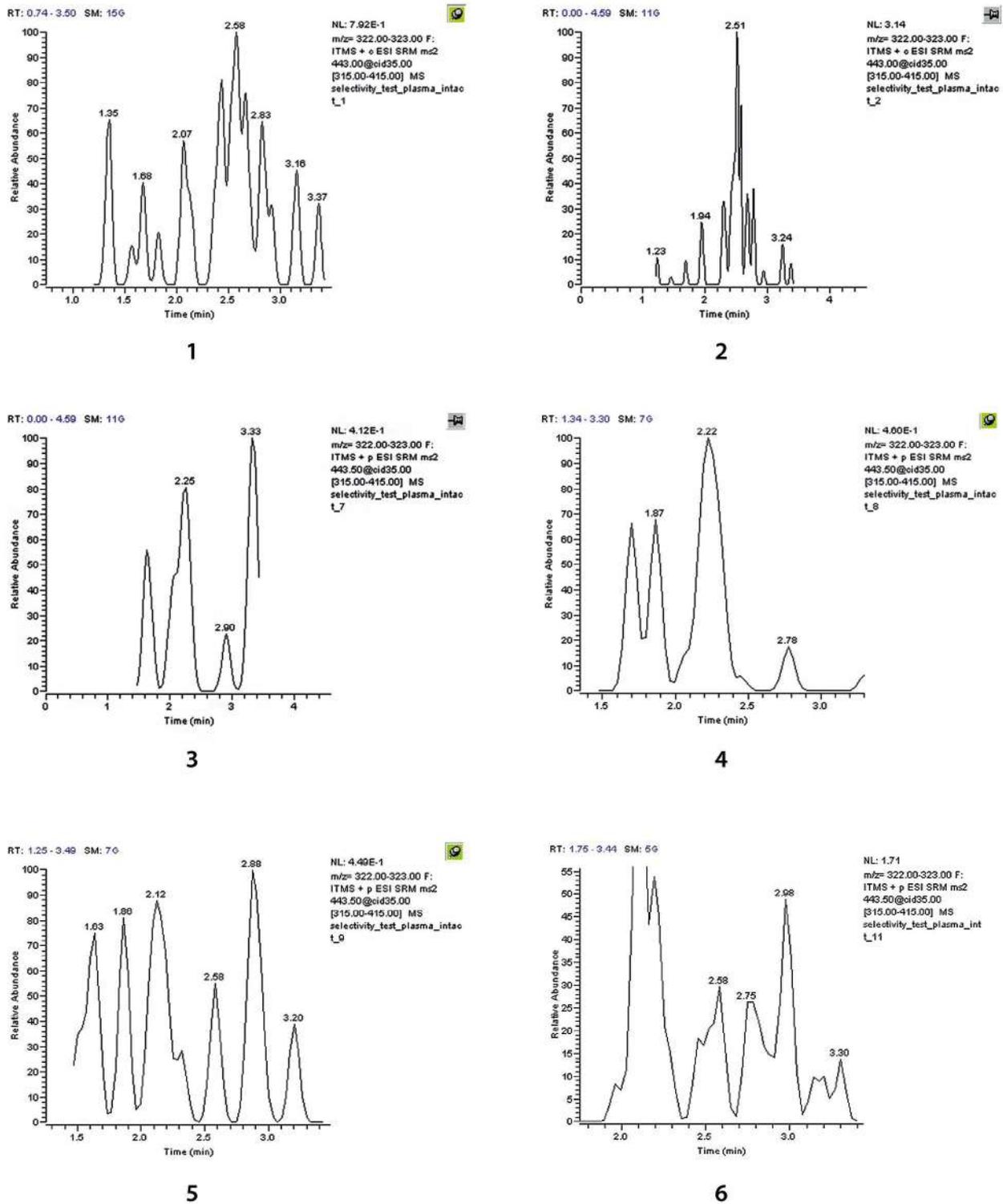


Рисунок 2.1. Нулевая плазма крови от шести разных источников (1-6) в диапазоне сканирования элтромбопага

Figure 2.1. Zero blood plasma from six different sources (1-6) in the scan range of Eltrombopag

рицы в соответствии с биоаналитической методикой. Результаты представлены на рисунках 2 и 3. Полученные результаты показывают, что интерференции не наблюдается ни в одном из источников ни на одном из исследуемых пиков, методика обладает при-

емлемой селективностью. Селективность методики считается удовлетворительной при условии, что показатели не больше 20 % от нижней концентрации определяемых веществ и не больше 5 % от содержания внутреннего стандарта.

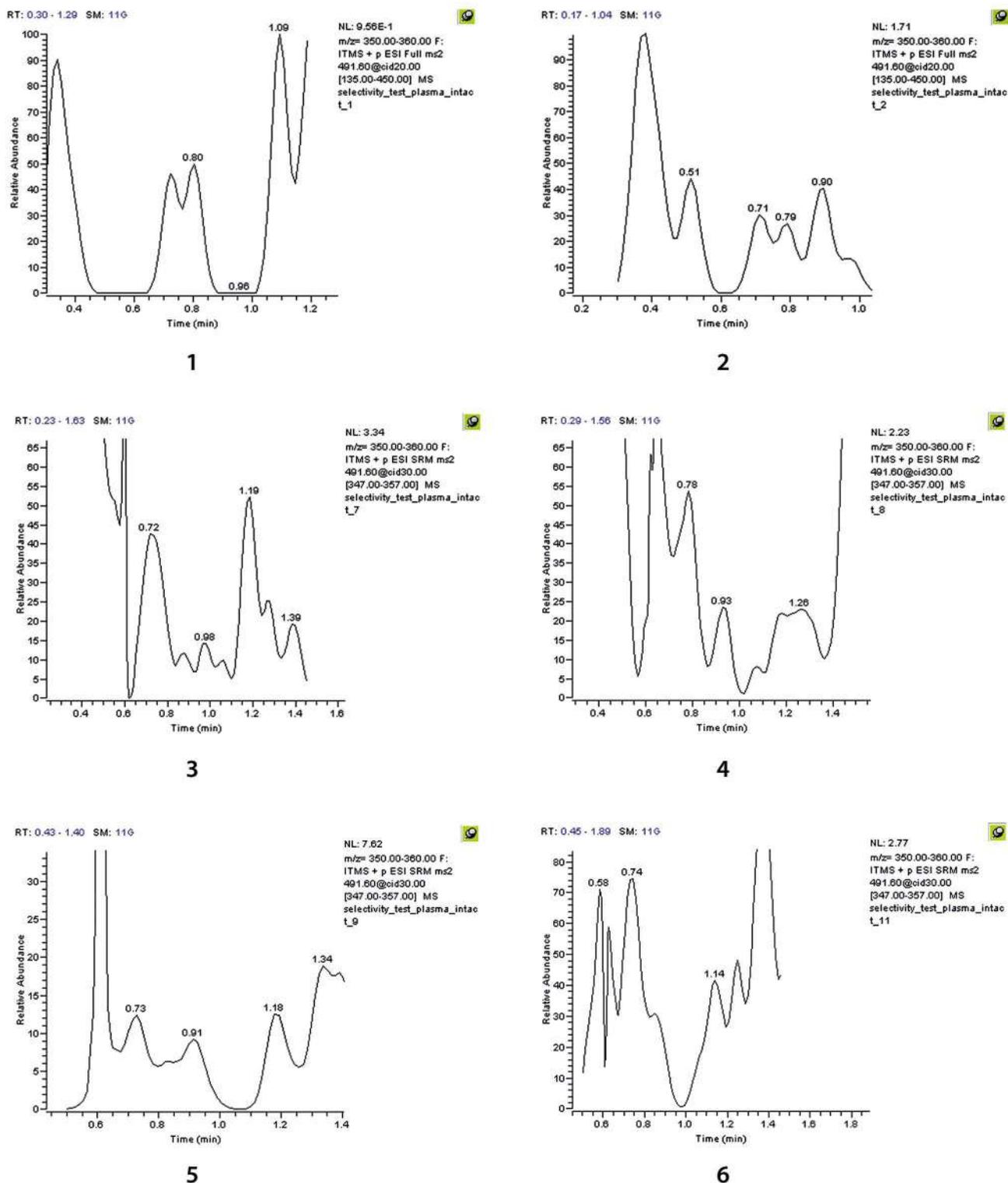


Рисунок 3. Нулевая плазма крови от шести разных источников (1–6) в диапазоне сканирования внутреннего стандарта
Figure 3. Zero blood plasma from six different sources (1–6) in the scan range of the internal standard

Эффект матрицы

Изучено влияние матрицы на получаемые результаты в условиях биоаналитической методики. Для этого готовили и анализировали растворы холостой матрицы, к ним добавляли аналит на уровне ННК и

ВКК в соответствии с биоаналитической методикой (в таблицах 3–4). Кроме этого, готовили растворы, в которых холостая матрица была заменена на воду (для расчета абсолютного матричного фактора). Результаты выполненной работы представлены в табли-

цах 7–8. Для нормализованного матричного фактора CV не превышает 15 %. Для абсолютного матричного фактора не наблюдается ни подавления, ни усиления сигнала. Влияние матрицы стабильное.

Таблица 7. Расчет нормализованного матричного фактора

Table 7. Calculation of the normalized matrix factor

Раствор Solution	S_{t_0}	S_{t_0}	Нормализованная площадь ЭЛТР без матрицы Normalized ELTR area without matrix	S_t	S_{t_0}	Нормализованная площадь ЭЛТР с матрицей Normalized ELTR area with matrix	MF	CV, %
НKK LQC	51	652	0	49	654	0	1	4
	49	654	0	51	656	0	1	
	47	612	0	48	658	0	1	
	48	627	0	47	653	0	1	
	50	668	0	46	651	0	1	
	49	647	0	44	621	0	1	
ВKK HQC	9366	662	141	8990	661	136	1	4
	9288	639	145	8755	639	137	1	
	8999	622	145	8749	635	138	1	
	9211	637	145	8762	697	126	1	
	9087	644	141	8788	655	134	1	
	9120	672	136	9122	644	142	1	

Калибровочная кривая

В 7 образцов интактной плазмы крови до определенных концентраций добавляли рабочие растворы внутреннего стандарта глимепирида и стандартные смешанные рабочие растворы элтромбопага (таблица 2). В результате полученных данных после проведенного анализа описанных образцов были построены калибровочные графики (рисунок 3), включая уравнение калибровочной кривой.

В соответствии с биоаналитической методикой (в таблицах 3–4) были приготовлены растворы k . Должно быть не менее 7 уровней концентраций. Затем их проанализировали и построили градуировочную кривую. Также рассчитали уравнение кривой и коэффициент корреляции. Произвели обратный пересчет найденного количества по градуировочной кривой. Методика имеет линейный отклик в интервале концентраций от 10,12 нг до 6748,29 нг в 1 мл плазмы крови человека. Описана уравнением $y = kx + b$. Коэффициент корреляции приближается к 1 (значительно выше 0,98). Ни одна из ошибок при обратном пересчете концентраций не превышает допустимых пределов.

Результаты представлены в таблице 9 и на рисунке 4.

Таблица 8. Расчет абсолютного матричного фактора

Table 8. Calculation of the absolute matrix factor

Наименование раствора Solution name	S	Отношение средних S Average S ratio	CV, %	Наименование раствора Solution name	S	Отношение средних S Average S ratio	CV, %	Наименование раствора Solution name	S	Отношение средних S Average S ratio	CV, %
НKK без добавление матрицы LQC without matrix addition	51	1,03	4,25	ВKK без добавление матрицы HQC without matrix addition	9366	1,04	2,41	Внутренний стандарт без добавление матрицы Internal standard without matrix addition	662	0,986	3,10
	49				9288				639		
	47				8999				622		
	48				9211				637		
	50				9087				644		
	49				9120				672		
Среднее Average	49			Среднее Average	9179			Среднее Average	646		
CV,%	2,9			CV,%	1,5			CV,%	2,8		
НKK с добавлением матрицы LQC with matrix addition	49			ВKK с добавлением матрицы HQC with matrix addition	8990			Внутренний стандарт с добавлением матрицы Internal standard with matrix addition	661		
	51	8755	639								
	48	8749	635								
	47	8762	697								
	46	8788	655								
	44	9122	644								
Среднее Average	48			Среднее Average	8861			Среднее Average	655		
CV,%	5,1			CV,%	1,8			CV,%	3,5		

Таблица 9. Расчет линейности методики определения элтромбопага

Table 9. Calculation of the linearity of the method for determining Eltrombopag

$C_{\text{введ.}}$, нг/мл Injected concentration, ng/ml	$S_{\text{ЭЛТР}}/S_{\text{ЭЛТР}}$	S_{IS}	$S_{\text{ЭЛТР}}/S_{\text{IS}}/S_{\text{ЭЛТР}}/S_{\text{IS}}$	$C_{\text{ЭЛТР}}/C_{\text{IS}}/C_{\text{ЭЛТР}}/C_{\text{IS}}$	$C_{\text{найд.}}$, нг/мл C_{found} , ng/ml	Ошибка, % $E, \%$	Критерий приемлемости Acceptance criterion
10	20	675	0	0	9	-7	Не более 20 % No more than 20 %
10	19	635	0	0	10	-5	Не более 20 % No more than 20 %
30	46	694	0	0	28	-8	Не более 15 % No more than 15 %
30	47	682	0	0	29	-4	Не более 15 % No more than 15 %
337	452	625	1	0	357	6	Не более 15 % No more than 15 %
337	445	620	1	0	354	5	Не более 15 % No more than 15 %
1012	1256	590	2	1	1060	5	Не более 15 % No more than 15 %
1012	1198	598	2	1	997	-1	Не более 15 % No more than 15 %
1350	1455	589	2	1	1231	-9	Не более 15 % No more than 15 %
1350	1488	593	3	1	1250	-7	Не более 15 % No more than 15 %
1687	2156	584	4	1	1842	9	Не более 15 % No more than 15 %
1687	2355	660	4	1	1780	6	Не более 15 % No more than 15 %
5061	6388	667	10	4	4787	-5	Не более 15 % No more than 15 %
5061	6847	676	10	4	5063	0	Не более 15 % No more than 15 %
6750	9201	677	14	5	6796	1	Не более 15 % No more than 15 %
6750	9301	676	14	5	6880	2	Не более 15 % No more than 15 %

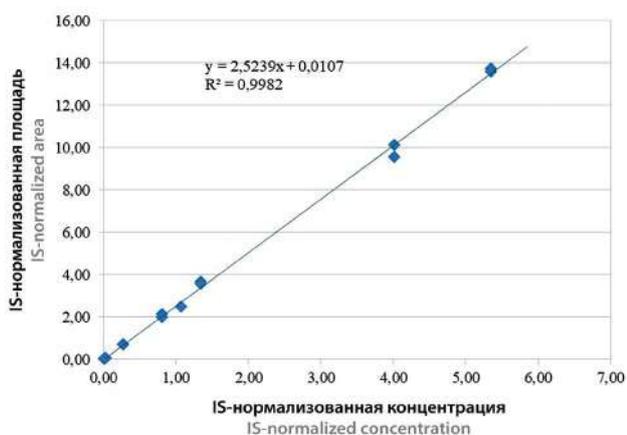


Рисунок 4. Графическое отображение линейного диапазона зависимости площади пика элтромбопага (нормализованной на внутренний стандарт) от концентрации (нормализованной на внутренний стандарт)

Figure 4. Graphical display of the linear range of the peak area of Eltrombopag (normalized to internal standard) versus concentration (normalized to internal standard)

Правильность

Правильность внутри цикла

Была изучена правильность биоаналитической методики внутри одного аналитического цикла. Для этого готовили и анализировали растворы k и $КК$ в соответствии с биоаналитической методикой (в таблицах 3–4). Обработывали полученные результаты. При оценке результатов были использованы критерии приемлемости. Результаты представлены в таблице 2. В результате ошибки найденной концентрации относительно введенной не превышает для минимальной концентрации (НПКО) 20 %, для всех остальных уровней не более 15 %. Правильность методики внутри цикла удовлетворительная (таблица 10).

Правильность и прецизионность

В таблице 2 представлен проведенный анализ калибровочных образцов плазмы крови, которые соответствуют уровням LLOQ, L, M и H. Анализ ва-

Таблица 10. Правильность определения элтромбопага в плазме крови человека (внутри цикла, день 1)

Table 10. Accuracy of determination of Eltrombopag in human blood plasma (within the cycle, day 1)

Раствор Solution	$C_{\text{введ.}}$, нг/мл Injected C , ng/ml	$C_{\text{ЭЛТР}}/C_{\text{IS}}$ $C_{\text{ELTR}}/C_{\text{IS}}$	$S_{\text{ЭЛТР}}$ S_{ELTR}	S_{IS}	f	$C_{\text{найд.}}$, нг/мл C_{found} , ng/ml	$C_{\text{найд. ср.}}$ нг/мл $C_{\text{found ср.}}$ ng/ml	s^2	S	P	t	Δ_x , нг Δ_x , ng	CV, %	e_r , %	Правильность, % Accuracy, %
НПК			19	646		9								-8	92
О			21	667		10								3	103
LLOQ	10	0	20	656	4	10	10	0	1	1	3	2	7	-2	98
			19	661		9								-11	89
			21	655		11								5	106
НKK			49	646		33								7	107
L			44	651		28								-6	94
	30	0	46	655	4	30	31	5	2	1	3	7	8	-2	98
			45	663		29								-6	94
			50	644		33								10	110
СКК			4988	656		3800								-6	94
M			4931	652		3779								-7	93
	4049	3	5188	657	4	3946	3977	51000	230	1	3	630	6	-3	98
			5325	662		4020								-1	99
			5764	664		4339								7	107
ВKK			9130	646		7067								5	105
H			8788	650		6760								0	100
	6748	5	9143	654	4	6991	6990	26000	160	1	3	450	2	4	104
			9041	652		6934								3	103
			9244	642		7200								7	107
$e_{\text{г ср.}}$, % $e_{\text{г срав.}}$, %														0	
s														6	
Δe_r , %														3	

лидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Правильность и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). В результате CV между средними результатами найденной концентрации элтромбопага, рассчитанное по 4 аналитическим циклам, выполненным в 4 разных дня по 4 разным градуировочным кривым, не превышает для

минимальной концентрации (НПКО) 20 %, для всех остальных уровней не более 15 %. Прецизионность методики между циклами удовлетворительная (таблица 11).

Нижний предел количественного определения (НПКО)

По данным о линейности, точности и прецизионности был определен нижний предел количественного определения методов. Методы НПКО – мини-

Таблица 11. Расчет прецизионности определения элтромбопага между циклами по растворам контроля качества

Table 11. Calculation of the precision of the determination of Eltrombopag between cycles of quality control solutions

Раствор Уровень Level	$C_{\text{найд. ср.}}$ нг/мл $C_{\text{found ср.}}$ ng/ml	CV, %	Критерий приемлемости Acceptance criterion			
	День 1 Day 1	День 2 Day 2	День 3 Day 3	День 4 Day 4		
LLOQ	10	10	10	10	3	Не более 20 % No more than 20 %
L	31	30	31	31	1	Не более 15 % No more than 15 %
M	3977	3941	4019	4020	1	Не более 15 % No more than 15 %
H	6990	6718	6608	7115	3	Не более 15 % No more than 15 %

мальная концентрация элтромбопага в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого можно количественно определить элтромбопаг со значениями RSD и E менее 20 %. Нижний предел обнаружения метода составил 10,12 нг/мл. Отношение сигнал/шум составляло 19 при концентрации 10,12 нг/мл (в пересчете на 1 мл плазмы крови человека). Раствор (НПКО) – менее строгий стандарт калибровки. Предел обнаружения элтромбопага составляет около 3,3 нг в 1 мл плазмы крови при использовании этого метода. Результат представлен на рисунке 5.

Стабильность

Изучена стабильность образцов, используемых на всех этапах биоаналитической методики. Краткосрочная стабильность: образцы стабильны после разморозки в течении 4 часов, финальные растворы стабильны в автосамплере 8 часов, образцы выдерживают 3 цикла разморозки/заморозки. Долгосрочная стабильность: стабильность испытуемых образцов подтверждена в течении 120 суток при температуре хранения -70°C и 45 суток при -20°C . Все исход-

ные растворы стабильны в течении всего времени использования (таблицы 12–14).

Таблица 12. Краткосрочная стабильность в период – с момента размораживания до финальной пробоподготовки

Table 12. Short-term stability during the period – from the moment of thawing to the final sample preparation

Раствор Solution	$C_{\text{найд. ср'}}$ нг/мл $C_{\text{found cp'}}$ ng/ml	4 часа хранения после стадии (МО ЭЛТР 05-20_Шаг 1) 4 hours storage after stage (MO ELTR 05-20 Step 1)		Критерий приемлемости Acceptance criterion
		$C_{\text{найд. ср'}}$ нг/мл $C_{\text{found cp'}}$ ng/ml	Ошибка, % E, %	
НKK LQC	31	32	3	Не более 15 % No more than 15 %
ВKK HQC	6990	7115	2	Не более 15 % No more than 15 %

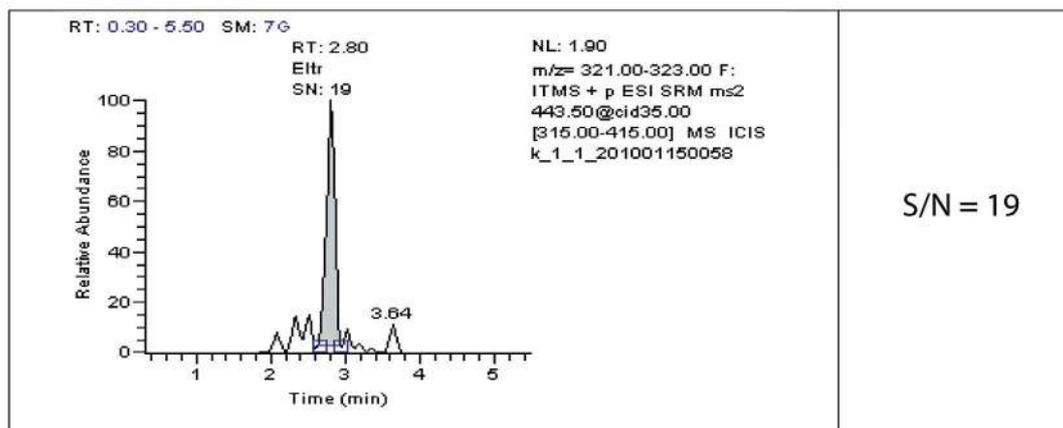


Рисунок 5. Расчет предела количественного определения элтромбопага

Figure 5. Calculation of the quantification limit for Eltrombopag

Таблица 13. Стабильность испытуемых растворов после финальной пробоподготовки при хранении в автосамплере $+4^{\circ}\text{C}$

Table 13. Stability of the tested solutions after the final sample preparation when stored in an auto sampler $+4^{\circ}\text{C}$

Раствор Solution	0 часов хранения в автосамплере 0 hours storage in auto sampler	4 часов хранения в автосамплере 4 hours storage in auto sampler		8 часов хранения в автосамплере 8 hours storage in auto sampler		CV, %	Критерий приемлемости Acceptance criterion
	$C_{\text{найд. ср'}}$ нг/мл $C_{\text{found cp'}}$ ng/ml	$C_{\text{найд. ср'}}$ нг/мл $C_{\text{found cp'}}$ ng/ml	Ошибка, % E, %	$C_{\text{найд. ср'}}$ нг/мл $C_{\text{found cp'}}$ ng/ml	Ошибка, % E, %		
НKK LQC	31	30	-2	30	-1	1	Не более 15 % No more than 15%
ВKK HQC	6990	7032	1	6984	0	0	Не более 15 % No more than 15%

Таблица 14. Долгосрочная стабильность при естественных условиях хранения

Table 14. Long-term stability under natural storage conditions

Раствор Solution	С _{введ.} , нг/мл Injected C, ng/ml	Точка 0 Point 0		Хранение 30 суток Storage 30 days		Хранение 45 суток Storage 45 days		Хранение 120 суток Storage 120 days		CV, %	Критерий приемлемости Acceptance criterion
		С _{найд.-ср} C _{found ср} , нг/мл ng/ml	Ошибка, % E, %	С _{найд.-ср} C _{found ср} , нг/мл ng/ml	Ошибка, % E, %	С _{найд.-ср} C _{found ср} , нг/мл ng/ml	Ошибка, % E, %	С _{найд.-ср} C _{found ср} , нг/мл ng/ml	Ошибка, % E, %		
НKK (хранение при -20 °C) LQC (storage at -20 °C)	30	30	0	30	-2,7	28	-7	-	-	3	Не более 15 % No more than 15 %
НKK (хранение при -70 °C) LQC (storage at -70 °C)	30	29	-6	30	-1	29	-3	-	-	2	Не более 15 % No more than 15 %
ВKK (хранение при -20 °C) HQC (storage at -20 °C)	6748	6954	3	6712	-1	6796	1	6724	0	2	Не более 15 % No more than 15 %
ВKK (хранение при -70 °C) HQC (storage at -70 °C)	6748	6947	3	6839	1	6839	1	6755	0	1	Не более 15 % No more than 15 %

При изучении стабильности образцов не было найдено каких-либо ошибок, превышающих допустимые пределы, данные образцы были стабильны после разморозки в течении 4 часов. Дальнейшее изучение более 4 часов не рационально, так как на пробоподготовку одной серии уходит не более 1,0 часа (при крайних вариантах).

Эффект переноса (carry-over)

Анализ калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови демонстрирует отсутствие пиков, которые соответствовали по временам удерживания пикам исследуемых веществ и внутреннего стандарта с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. На хроматограммах холостой матрицы после ввода раствора с максимальной концентрацией (к8) пики определяемых веществ отсутствуют. Эффект переноса также отсутствует. Результаты представлены на рисунке 6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые был успешно разработан и апробирован высокоселективный метод ВЭЖХ МС/МС для определения элтромбопага в плазме крови человека. Аналитическое время этого метода составляло 5,5 мин, что было быстрее, чем у обычного метода ВЭЖХ, и в этом методе наблюдалась высокая чувствительность (НПКО для элтромбопага составлял 10 нг в 1 мл плазмы крови). При исследовании аналитического диа-

пазона препарат элтромбопаг в плазме составил 10–6750 нг/мл. Эффект матрицы был нормализованный НKK – 3,6 %, ВKK – 4,1 %. «Элтромбопаг» стабилен в плазме крови в течение 4 часов при комнатной температуре, 8 часов после подготовки образца, трех циклов замораживания/оттаивания и 120 дней при температуре хранения -70 °C. Диапазон правильности находится внутри и между аналитическими циклами в соответствии с максимальными отклонениями для внутрисерийных 89,1–106,7 % и для межсерийных: 98,3–102,6 %. Диапазон прецизионности был для внутрисерийных: 2,3 –7,0 % и для межсерийных: 2,8–3,4 %. Простое и быстрое осаждение белка использовалось для извлечения образцов перед анализом ВЭЖХ МС/МС. Метод показал хорошую правильность, прецизионность и широкий линейный диапазон концентраций. Следовательно, этот метод является «золотым стандартом» для получения достоверных, надёжных и точных результатов клинического исследования в области фармакокинетики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ahmed M.A., Yassin M.A. Low-Dose Eltrombopag in a Patient with Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Post Sleeve Gastrectomy. *Case Rep. Oncol.* 2020;(13):655–658. DOI: 10.1159/000507755.
- AL-Dhuraibi A. M., Pokrovskiy M.V. Evaluation of Eltrombopag Efficacy in Patients with Hepatitis C-induced Thrombocytopenia: Systematic Reviews of Meta-Analysis. *NVEO-NATURAL VOLATILES Essent. OILS Journal NVEO.* 2021;5453–5471.

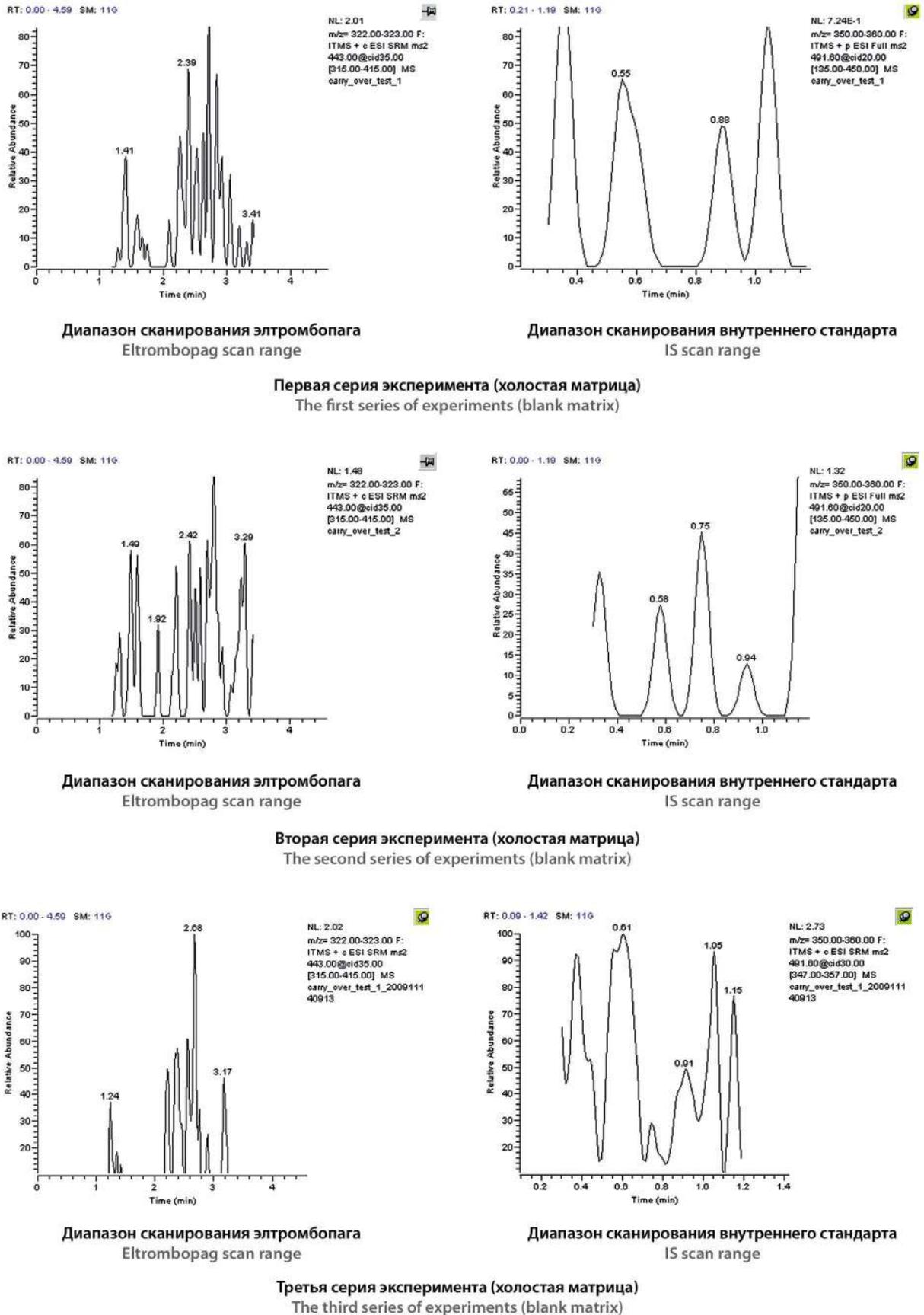


Рисунок 6. Результаты анализа калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови

Figure 6. Results of analysis of calibration samples and intact blood plasma sample

3. Marano M., Serafinelli J., Cairoli S., Martinelli D., Pisani M., Palumbo G., Cefalo M. G., Cecchetti C., Di Nardo M., Falvella F. S., Goffredo B. M. Eltrombopag-Induced Acute Liver Failure in a Pediatric Patient: A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2018;40(4):386–388. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000522.
4. Yanagimachi N., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Chiba S., Doki K., Homma M. A simple HPLC assay for determining eltrombopag concentration in human serum. *Biomedical Chromatography*, 2021;35(5):e5049. DOI: 10.1002/bmc.5049.
5. Bauman J. W., Vincent C. T., Peng B., Wire M. B., Williams D. D., Park J. W. Effect of hepatic or renal impairment on eltrombopag pharmacokinetics. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;51(5):739–750. DOI: 10.1177/0091270010372106.
6. Cheng T. H. T., Tsui T. K. C., Kwok J. S. S., Lit L. C. W., Wong E. Y. L., Kam R. K. T., Grote-Koska D., Staaden A., Okada H., Fuke N., Wong R. S. M., Li C.-K., Chan M. H. M. Comprehensive characterization and resolution of discrepant spectrophotometric bilirubin results in patients on eltrombopag therapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2020;58(10):1713–1723. DOI: 10.1515/cclm-2019-0684.
7. Jayagopal B., Murugesh S. QBD-driven HPLC method of eltrombopag olamine: Degradation pathway proposal, structure elucidation, and in silico toxicity prediction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;203:114231. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114231.
8. Maddela R., Gajula R., Pilli N. R., Siddiraju S., Maddela S., Makula A., eltrombopag in 50 µL of human plasma: A pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;98:68–73. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.028.
9. Mohan T. S. S. J., Mukkanti K., Jogia H. A. Stability indicating UHPLC method, development and validation for estimation of eltrombopag and related impurities in tablet dosage form. *Oriental Journal of Chemistry*. 2018;34(2):1098–10104. DOI: 10.13005/ojc/340262.
10. Gosai S., Jadav K., Stability indicating analytical method development and validation of eltrombopag olamine in tablet dosage form by RP-UPLC. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*. 2020;7(3):845–850. DOI: 10.18596/jotcsa.724484.
11. Mayank S., Geeta V., Chaudhari P. S., Suleman S. K. Department. European of Biomedical AND Pharmaceutical sciences. development and validation of stability indicating rp-hplc method for estimation of eltrombopag olamine in. *Eur J Biomed Eur J Biomed Pharm Sci*. 2018;5(11):454–460.
12. Wire M. B., Bruce J., Gauvin J., Pendry C. J., McGuire S., Qian Y., Brainsky A. A randomized, open-label, 5-period, balanced crossover study to evaluate the relative bioavailability of eltrombopag powder for oral suspension (PfOS) and tablet formulations and the effect of a high-calcium meal on eltrombopag pharmacokinetics when admin. *Clinical therapeutics*. 2012;34(3):699–709. DOI: 10.1016/j.clinthera.2012.01.011.
13. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. T. II. Moscow: Grif i K; 2013. 280 p. (In Russ.)