

Количественное определение бортезомиба в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Т.Д.Исмагилов

Институт клинической фармакологии ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Росздрав, Москва

Множественная миелома (ММ) – это злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или в моче и остеолитическими поражениями костей. ММ составляет 1% от всех онкологических заболеваний и немногим более 10% среди всех гемобластозов. Благодаря значительным успехам в фундаментальных исследованиях, посвященных биологии ММ, на рубеже XXI века появились новые эффективные лекарственные препараты. Целый ряд лекарственных средств разработан на основе воздействия на механизмы, посредством которых регулируется рост миеломных клеток и их апоптотическая смерть, состояние микроокружения костного мозга, межклеточная передача сигналов в миеломные клетки. К наиболее перспективным лекарственным препаратам относится бортезомиб. Актуальным представляется клинико-фармакологическое изучение российского генерического препарата бортезомиба – Миланфор.

Цель. Разработка метода количественного определения бортезомиба в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектором и изучение фармакокинетики бортезомиба после однократного и на фоне курсо-

вого применения препарата Миланфор у пациентов с миеломной болезнью.

Материалы и методы

Концентрация бортезомиба определяется методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Препарат Миланфор вводили путем в/в болюсной инъекции в дозе 1,3 мг/м² через периферический или центральный венозный катетер, который затем промывали 0,9 % раствором натрия хлорида для инъекций. Также у данных пациентов определялась равновесная концентрация бортезомиба на фоне курсового лечения на 4, 8, 11 день 1-го цикла и 1 день 2-го цикла через 2 часа после введения очередной дозы препарата. Отбор проб проводили через определенные промежутки времени, в гепаринизированные пробирки. Кровь центрифугировали при 3000 об/мин и полученную плазму хранили при -35°C до анализа.

Подготовка проб плазмы крови для анализа:

К 0,5 мл плазмы добавляли 2 мл ацетонитрила с 0,1% раствором муравьиной кислоты, встряхивали на вихревой мешалке vortex 5 минут и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносили в чистые пробирки, упаривали, сухой остаток растворяли в 100 мкл смеси вода – ацетонитрил (90:10) с 0,1 % муравьиной кислотой, встряхивали на vortex, 50 мкл полу-

ченного раствора вводили в автосамплер хроматографа.

Хроматографическое определение: Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» (США) с масс-спектрометрическим детектором. Колонка Zorbax C18, (4,6 × 150 мм, 5 мкм) Температура разделения 30°C. Исследование осуществлялось в градиентном режиме.

Скорость потока 0,7 мл/мин. Время выхода пика бортезомиба 1,6 мин. Детектирование проводилось по протонированному молекулярному иону бортезомиба с m/z ... Фрагментатор 35В, температура азота -300°C, расход газа 3 л/

ставляет $96,6 \pm 52,8$ нг/мл. При этом наблюдается выраженный индивидуальный разброс значений (до 60Δ%). Далее концентрация бортезомиба в плазме резко снижается, переходя в более длительные фазы распределения и терминальную фазу. Для исследуемого препарата характерен сравнительно высокий общий клиренс после однократного введения с высоким уровнем распределения, что свидетельствует об интенсивном распределении препарата в периферических тканях. На фоне курсового применения отмечается уменьшение клиренса и увеличение периода полувыве-

Таблица

Экспозиция препарата в подвижной фазе

Время, мин	А, %	В, %
0-0,25	90	10
0,25-1,0	—	100
1,0-2,5	90	10

Примечание: Подвижная фаза: А – вода, 0,1 % муравьиная кислота; В – 90% ацетонитрил, 10 % вода, 0,1 % муравьиная кислота.

мин, давление небулайзера 35 psig.

Основой для количественного определения (метод абсолютной калибровки) бортезомиба в плазме крови служили калибровочные зависимости, для построения которых были проанализированы образцы плазмы крови с различной концентрацией определяемого вещества с использованием программного обеспечения фирмы «Agilent». Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 0,5-100 нг/мл. Коэффициент корреляции составил $r^2=0,99$.

Результаты и их обсуждение

Максимальная концентрация бортезомиба после однократного в/в введения достигается практически сразу и со-

ведения, что связано с кумуляцией препарата в организме.

Выводы

Разработана высокочувствительная и селективная методика экстракции и количественного определения бортезомиба в плазме крови с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детекцией. Методика характеризуется высокой воспроизводимостью и низким пределом обнаружения (1 нг/мл). С помощью разработанной методики изучена фармакокинетика препарата Миланфор после однократного и курсового применения. Показано, что равновесная концентрация бортезомиба при приеме препарата Миланфор находилась в терапевтическом диапазоне.