

Walidacja metody HPLC UV-Vis oznaczenia stężenia olaparybu w osoczu ludzkim

Validation of the HPLC UV-Vis method for the determination of olaparib concentration in human plasma

Marta Grzebalska¹, Hanna Urjasz²

¹ Studenckie Koło Naukowe Farmacji Klinicznej, Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Opiekun Koła Naukowego Edyta Szalek

² Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. Olaparyb należący do grupy silnych inhibitorów polimeraz poli-ADP-rybozy (PARP-1, PARP-2) jest wykorzystywany w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi chemioterapeutykami w celu hamowania wzrostu nowotworów. Opracowano więc metodę analityczną oznaczania stężenia olaparybu w osoczu ludzkim z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w nadfiolecie HPLC UV, dzięki której można monitorować poziom terapeutyczny leku. **Materiał i metody.** Wykorzystano ekstrakcję w fazie ciekłej do oczyszczenia próbek. Rozdział chromatograficzny metodą gradientową przeprowadzono na kolumnie Symmetry C8, 5 µm; 4,6 x 250 mm przy użyciu 0,2% roztworu kwasu octowego, wody i metanolu. Detekcja UV przy $\lambda_{\max} = 254$ nm. Objętość nastrzyku 20 µL. **Wyniki.** Walidacja została opracowana w oparciu o wytyczne EMA dotyczące metod bioanalitycznych ICH M10. **Wnioski.** Metoda okazała się selektywna, dokładna, precyzyjna i liniowa w zakresie 100-5000 ng/ml ze współczynnikiem korelacji większym niż 0,999. (*Farm Współ* 2021; 14: 294-298) doi: 10.53139/FW.20211438

Słowa kluczowe: walidacja metody bioanalitycznej; HPLC UV-Vis; stężenie leku w osoczu; olaparyb; inhibitory PARP

Abstract

Introduction. Olaparib, one of the strong inhibitors of poly-ADP-ribose polymerase (PARP-1, PARP-2), is used alone or in combination with other chemotherapeutic drugs to inhibit tumor growth. Therefore, an analytical method was developed to determine the concentration of olaparib in human plasma using HPLC UV high performance liquid chromatography, which allows the therapeutic level of the drug to be monitored. **Material and methods.** Concentration of olaparib in human plasma was determined by the high performance liquid chromatography in ultraviolet HPLC UV. Liquid phase extraction was used to purify the samples. The gradient chromatographic separation was performed on Symmetry C8, 5 µm; 4.6 x 250 mm column using 0.2% acetic acid solution, water and methanol. UV detection at $\lambda_{\max} = 254$ nm. Injection volume was 20 µL. **Results.** The validation was based on the EMA guidelines for bioanalytical methods ICH M10. **Conclusions.** The method proved to be selective, accurate, precise and linear over the range 100-5000 ng/ml with a correlation coefficient greater than 0.999. (*Farm Współ* 2021; 14: 294-298) doi: 10.53139/FW.20211438

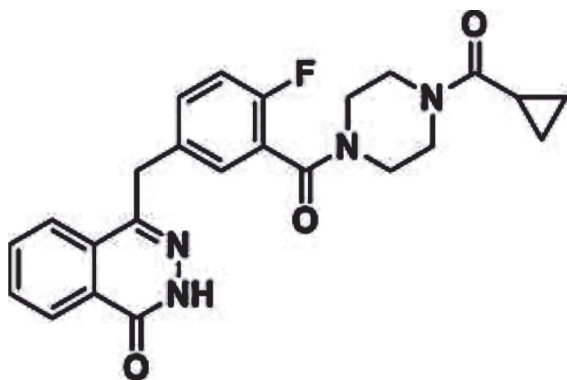
Keywords: bioanalytical method validation; HPLC UV-Vis; plasma drug concentration; olaparib; PARP inhibitors

Wstęp

Nową grupę leków onkologicznych stanowią inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) stosowane m.in. w leczeniu platynowrażliwego raka

jajnika oraz piersi [1-3]. Przedstawicielem tej grupy jest olaparyb (rycina 1).

Olaparyb jako pierwszy uzyskał aprobatę Komisji Europejskiej (2014) i amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (2015) do stosowania u pacjentów



Rycina 1. Wzór strukturalny cząsteczki olaparybu
Figure 1. Structural formula of the olaparib molecule

z rakiem jajnika z mutacją BRCA [4,5]. Do oznaczeń stężeń inhibitorów PARP wykorzystuje się różne techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC np. sprzężonej z tandemową spektrometrią mas HPLC MS/MS [6,7] oraz z detekcją UV-Vis [8,9]. Z uwagi na koszty analiz celowym wydaje się wykorzystanie równie dokładnej i powtarzalnej metody, jaką jest HPLC UV-Vis. Ze względu na duży potencjał terapeutyczny inhibitorów PARP metody analityczne, które zapewniają precyzyjne pomiary stężeń w próbkach biologicznych mogą mieć wpływ na optymalizację dawkowania leku i poprawę przewidywania odpowiedzi na lek. Dlatego celem niniejszego badania jest opracowanie zwalidowanej metody do ilościowego oznaczania stężeń olaparybu w osoczu ludzkim zgodnie z wytycznymi EMA dla metod bioanalitycznych ICH M10 [10].

Materiały i metody

Odczynniki

W badaniu stosowano olaparyb (Sigma-Aldrich), DMSO (Sigma-Aldrich), 4-acetaminofenol (IS) (LRAB37/1, Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), wodorowęglan sodu (LRAB37/1, POCH S.A.), węglan sodu (91K0095, Sigma Aldrich), eter *t*-butylo-wometylowy (I1060145948, SULPECO), kwas octowy cz.d.a. 80% (1098/08/12, POCH S.A.). Wodę ultraczystą uzyskano za pomocą systemu oczyszczania wody Direct-Q 3UV (MerckMillipore, Darmstadt, Niemcy). Wykorzystano osocze standaryzowane pochodzące z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu.

Aparatura i warunki rozdzielania

Analizę próbek przeprowadzano na aparacie Alliance 2695 wyposażonym w detektor UV-Vis oraz software Empower Pro 1154 (Waters). Rozdział zachodził w odwróconym układzie faz na kolumnie Symmetry (C8, 5 μ m; 4,6 mm x 250 mm, Waters) w warunkach gradientowych fazy ruchomej składającej się z 0,2% wodnego roztworu kwasu octowego, wody ultraczystej oraz metanolu. Szybkość przepływu 1 mL/min. Objętość nastrzyku wynosiła 20 μ L. Temperatura kolumny 25°C, detekcja UV-Vis przy długości fali $\lambda_{\max} = 254$ nm. Czas rozdzielania wynosił 28 minut.

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej i próbek kontrolnych

Roztwór podstawowy olaparybu (1 mg/mL) i 4-acetaminofenolu (IS) (1 mg/mL) przygotowano w metanolu. Serię roztworów wzorcowych olaparybu oraz IS o stężeniu 40 μ g/mL przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworów wzorcowych metanolem. Próbki do krzywej kalibracyjnej zostały przygotowane poprzez dodanie do 425 μ L osocza 25 μ L roztworu IS oraz odpowiedniej objętości roztworu wzorcowego olaparybu do uzyskania stężenia odpowiadającego punktom krzywej kalibracyjnej: 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ng/mL. Próbki kontrolne (QC) olaparybu przygotowano dla 4 stężeń: LLOQ (100 ng/mL), 3x LLOQ (300 ng/mL), średnie (2000 ng/mL) i wysokie (3800 ng/mL).

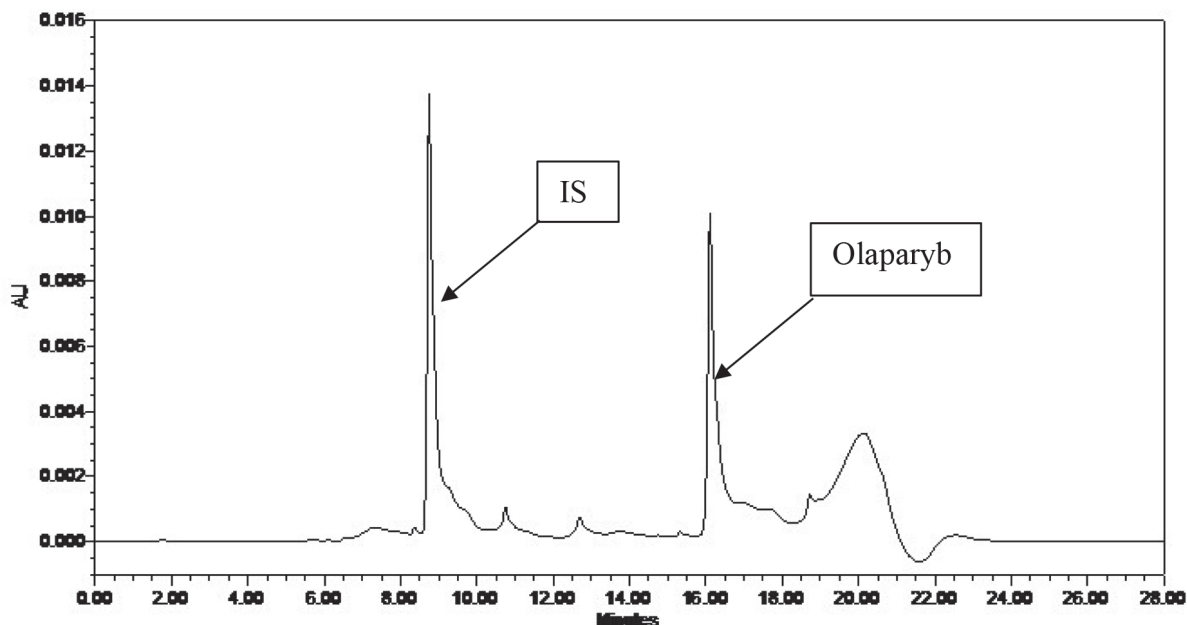
Ekstrakcja próbki

Do 425 μ L osocza dodano 25 μ L roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 40 μ g/mL oraz odpowiednią objętość roztworów wzorcowych olaparybu tak, aby całkowita objętość próbki wynosiła 500 μ L. Do tak przygotowanej próbki dodano 100 μ L roztworu buforu wodorowęglanowego o pH~9 oraz 2 mL eteru *t*-butylo-wometylowego. Roztwory mieszano za pomocą shakera przez 20 sekund, następnie wytrząsano 5 minut, po czym wirowano 5 minut. Pobrano 1,6 mL warstwy organicznej, odparowywano do sucha rozpuszczalnik w temperaturze 60°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 μ L fazy ruchomej. Nastrzykiwano 20 μ L w auto-samplerze.

Wyniki i wnioski

Selektywność

Selektywność oceniano przy użyciu prób ślepych uzyskanych z 6 różnych źródeł. Ocena selektywności



Rycina 2. Chromatogram próby kontrolnej QC olaparybu o stężeniu 4000 ng/mL i IS
 Figure 2. Chromatogram of spiked human plasma containing 4000 ng/mL olaparib (QC) and IS

wykazała brak interferencji w czasach retencji olaparybu i IS. W warunkach analitycznych czasy retencji olaparybu i standardu wewnętrznego wynosiły odpowiednio 16 minut i 9 minut (rycina 2).

Efekt tła (ang. *matrix effect*)

Efekt tła oceniano, analizując po 3 powtórzenia dla niskiego i wysokiego stężenia olaparybu w próbce kontrolnej odpowiednio QCL 200 ng/mL i QCH 3800 ng/mL przy użyciu matrycy pochodzącej z 6 różnych źródeł. Dokładność mieściła się w granicach $\pm 15\%$ stężenia nominalnego analitu, a współczynnik zmienności był mniejszy od 15%.

Liniowość, dokładność

Metoda analityczna wykazała dobrą liniowość w zakresie stężeń 100 - 5000 ng/mL. Równanie średniej krzywej kalibracyjnej ma postać $y=2,0910^{-4}x-1,2510^{-2}$ ze współczynnikiem korelacji r większym niż 0,999 dla 4 różnych dni. Wyniki dokładności dla 3 serii przed-

stawia tabela I, natomiast wyniki dokładności między seriami wraz z akceptowalnymi kryteriami zawarte są w tabeli II. Wykonano analizę 4 przygotowanych stężeń, każde z nich powtórzono 5-cio krotnie. Badanie powtórzono w 3 seriach w ciągu 3 następujących po sobie dniach.

Odzysk

Odzysk olaparybu z osocza ludzkiego wyznaczono poprzez porównanie pól powierzchni pików analitu pochodzących z ekstrahowanych próbek z polami powierzchni pików analitu z nieekstrahowanych roztworów wzorcowych w trzech poziomach stężeń próbek kontrolnych olaparybu: niskie QCL 100, średnie QCM 2000, wysokie QCH 5000 ng/mL. Średni odzysk olaparybu wynosił odpowiednio 18,94, 21,63 i 17,13%, natomiast dla wzorca wewnętrznego 28%. Otrzymane rezultaty wskazują, że wydajność ekstrakcji metody analitycznej była spójna i powtarzalna.

Tabela I. Dokładność oznaczeń stężeń olaparybu dla trzech serii

Table I. Within-run accuracy for olaparib for 3 series

C_{teor} [ng/mL]		C_{obl} [ng/mL]					$S \pm SD$ [ng/mL]	Acc [%]
100	1 seria	111,63	119,14	118,67	119,38	115,78	116,92 \pm 3,29	116,9
	2 seria	116,19	117,94	118,97	119,43	117,53	118,01 \pm 1,27	118,0
	3 seria	107,10	113,64	119,61	106,40	105,33	110,42 \pm 6,08	110,4
300	1 seria	271,25	263,81	268,13	263,58	266,48	266,65 \pm 3,20	88,9
	2 seria	332,91	333,65	321,50	331,13	290,32	321,90 \pm 18,32	107,3
	3 seria	335,53	321,14	325,14	339,89	399,97	324,33 \pm 15,59	108,1
2000	1 seria	1877,54	1958,66	2016,69	2053,69	1723,77	1927,0 \pm 131,19	96,3
	2 seria	1718,01	1791,05	1755,65	1724,48	1852,10	1768,26 \pm 55,11	88,4
	3 seria	1718,09	1757,88	2279,38	1706,64	1762,10	1844,82 \pm 244,13	92,2
3800	1 seria	3923,70	3428,66	3568,84	3334,63	3775,61	3606,29 \pm 242,99	94,9
	2 seria	3467,32	3339,65	3671,55	4305,00	3998,28	3756,36 \pm 394,94	98,9
	3 seria	3260,96	3406,81	3731,19	3810,63	3519,55	3545,83 \pm 224,74	93,3

C_{teor} – stężenie teoretyczne, C_{obl} – stężenie obliczone, S – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Acc - dokładność

Tabela II. Dokładność oznaczeń stężeń olaparybu między seriami

Table II. Between-run accuracy for olaparib

C_{teor} [ng/mL]	C_{obl} [ng/mL]			$S \pm SD$ [ng/mL]	Acc [%]
100	116,92	118,01	110,42	115,12 \pm 4,10	115,1
300	266,65	321,90	324,33	304,29 \pm 32,62	101,4
2000	1927,07	1768,26	1844,82	1846,72 \pm 79,42	92,3
3800	3606,29	3756,36	3545,83	3636,16 \pm 108,40	95,7

C_{teor} – stężenie teoretyczne, C_{obl} – stężenie obliczone, S – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, Acc - dokładność

Tabela III. Wyniki badań stabilności krótkoterminowej olaparybu

Table III. Short-term olaparib stability

C_{teor} [ng/mL]	C_{obl} [ng/mL]			$S \pm SD$ [ng/mL]	CV [%]
300	274,62	318,26	329,66	307,52 \pm 29,05	9,4
3800	3813,96	3261,12	3150,45	3408,51 \pm 355,47	10,4

C_{teor} – stężenie teoretyczne, C_{obl} – stężenie obliczone, S – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności

Tabela IV. Wyniki badań stabilności długoterminowej olaparybu

Table IV. Long-term olaparib stability

C_{teor} [ng/mL]	C_{obl} [ng/mL]			$S \pm SD$ [ng/mL]	CV [%]
300	329,90	300,49	324,39	318,26 \pm 15,63	4,9
3800	3763,20	3864,16	3424,16	3683,84 \pm 230,48	6,3

C_{teor} – stężenie teoretyczne, C_{obl} – stężenie obliczone, S – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności

Efekt przeniesienia próby (ang. carry-over)

Badanie przeniesienia analitu do próby ślepej dla metody oznaczania stężenia olaparybu w osoczu ludzkim nie przekracza 20% LLOQ i 5% IS.

Stabilność

Stabilność olaparybu badano dla 2 stężeń próbek kontrolnych: niskiego QCL 300 ng/mL i wysokiego QCH 3800 ng/mL, po 3 powtórzenia dla każdego.

Próbki zamrożono, przeprowadzono 3 cykle naprzemiennego rozmrażania i zamrażania w temperaturze -20°C . Próbki rozmrażano co 24 godziny przez 3 kolejne dni. Za pełne rozmrożenie uznano godzinę po całkowitym rozmrożeniu osocza. W przypadku badań stabilności krótkoterminowej analizę przeprowadzono od razu po 3 dniach rozmrażania - zamrożenia. Wyniki badań stabilności długoterminowej uzyskano po upływie 3 miesięcy od ostatniego zamrożenia. Przez ten czas próbki były umieszczone w zamrażalniku w temperaturze -20°C . Wyniki zawarto w tabelach III i IV.

Średnie stężenie na każdym poziomie w próbkach kontrolnych QC mieściło się w granicach $\pm 15\%$ nominalnego.

Wnioski

Metoda analityczna z wykorzystaniem wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej HPLC z detekcją UV-Vis przeznaczona do oznaczenia stężenia olaparybu w osoczu ludzkim została opracowana i zwalidowana z najniższym poziomem oznaczalno-

ści LOQ = 100 ng/mL. Nie zaobserwowano żadnych interferencji w obszarze analitu i IS. Jest selektywna, dokładna, precyzyjna i liniowa w zakresie stężeń 100-5000 ng/mL. Metoda ta z uwagi na swoją czułość i odtwarzalność może znaleźć zastosowanie w badaniach farmakokinetycznych i biorównoważności umożliwiając tym samym zindywidualizowanie farmakoterapii pacjenta.

Konflikt interesów / Conflict of interest
Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Hanna Urjasz
Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
ul. Rokietnicka 3, 60-806 Poznań
☎ (+48 61) 641 83 59
✉ hana@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Ferraris DV. Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors from concept to clinic. *J Med Chem.* 2010;53:4561-84.
2. Lupo B, Trusolino L. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: old and new paradigms revisited. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846:201-15.
3. Dufour R, Daumar P, Mounetou E, et al. BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib. *Sci Rep.* 2015;5:12670.
4. Brown JS, Kaye SB, Yap TA. PARP inhibitors: the race is on. *Brit J Cancer.* 2016;114:713-5.
5. Deeks ED. Olaparib: first global approval. *Drugs.* 2015;75:231-40.
6. Nijenhuis CM, Lucas L, Rosing H, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay quantifying olaparib in human plasma. *J Chromatogr B.* 2013;940:121-5.
7. Sparidans RW, Martens I, Valkenburg-Van Iersel LB, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the PARP-1 inhibitor olaparib in combination with the nitrogen mustard melphalan in human plasma. *J Chromatogr B.* 2011;879:1851-6.
8. Daumar P, Dufour R, Dubois C, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantitation of intracellular PARP inhibitor Olaparib in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;152:74-80.
9. Dufour R, Daumar P, Mounetou E, et al. BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib. *Sci Rep.* 2015;5:12670.
10. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf, data wejścia: 18.05.2021.