

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 615.033.1

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-128-134

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ВЭЖХ-МС/МС МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАНКОМИЦИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

*В.И. Петров<sup>1</sup>, И.С. Анিকেев<sup>1</sup>, Т.Е. Заячникова<sup>1</sup>, А.В. Стрыгин<sup>2</sup>, А.М. Доценко<sup>2</sup>, А.О. Стрыгина<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

<sup>2</sup> Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

**Автор, ответственный за переписку:** Андрей Валерьевич Стрыгин, drumsav@mail.ru

**Аннотация.** В рамках настоящего исследования был разработан метод количественного ВЭЖХ-МС/МС (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией) определения и проведена разработка и валидация метода количественного определения ванкомицина в плазме крови человека с помощью хромато-масс-спектрометрического метода. Методика была валидирована в соответствии с требованиями ЕАЭС, предъявляемыми к биоаналитическим методикам. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 1–100 мкг/мл в плазме крови.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ/МС, ванкомицин, валидация, количественное определение, плазма крови, биоаналитика

**Финансирование.** Грант РФФ: «Разработка популяционной фармакоэкономической модели для оценки прогностической значимости факторов вариабельности параметров фармакокинетики антибактериальных препаратов у новорожденных», в рамках соглашения от 10 июня 2022 г. № 11 между Российским научным фондом, Комитетом экономической политики и развития Волгоградской области и федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A QUANTITATIVE HPLC/MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF VANCOMYCIN IN BLOOD PLASMA

*V.I. Petrov<sup>1</sup>, I.S. Anikeev<sup>1</sup>, T.E. Zayachnikova<sup>1</sup>, A.V. Strygin<sup>2</sup>, A.M. Dotsenko<sup>2</sup>, A.O. Strygina<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

<sup>2</sup> Volgograd Scientific Medical Center, Volgograd, Russia

**Corresponding author:** Andrey V. Strygin, drumsav@mail.ru

**Abstract.** Within the framework of this study, a quantitative HPLC-MS/MS (high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection) method for the determination of vancomycin was developed. The method for the quantitative determination of vancomycin in human plasma was validated using the chromatographic-mass spectrometric method. The method was validated in accordance with the requirements of the EAEU for bioanalytical methods. The validated analytical range of the technique was 1–100 µg/mL in plasma.

**Keywords:** HPLC/MS, vancomycin, validation, quantitation, blood plasma, bioanalytics

**Funding.** RSF Grant: "Development of a population pharmacostatistical model to assess the prognostic significance of the variability factors of the parameters of the pharmacokinetics of antibacterial drugs in newborns", under the agreement of June 10, 2022. No. 11 between the Russian Scientific Foundation, the Committee for Economic Policy and Development of the Volgograd Region, and the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher education "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Заражение метициллинрезистентным и коагулазо-негативным стафилококком новорожденных приводит к сепсису, что является широко распространенным

фактором смертности среди данной группы пациентов. Данный факт определяет необходимость разработки стратегий безопасного и эффективного применения

антибактериальных препаратов, одним из которых и наиболее часто используемых является ванкомицин [1].

Однако стандартные режимы дозирования ванкомицина часто приводят к превышениям рекомендуемого уровня системной экспозиции из-за высокой вариабельности фармакокинетических параметров препарата, особенно у новорожденных детей. Следствием чего является повышенный риск нежелательных явлений и лекарственной нефротоксичности, что обуславливает необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) [1, 2].

Однако для успешного проведения ТЛМ необходимо применение новых валидированных методик и технологий, знание новых физико-химических подходов к пробоподготовке биообразцов и наличие современного оборудования. В связи с этим актуальной задачей для исследований ТЛМ ванкомицина является разработка и валидация новых физико-химических методов анализа лекарственных препаратов [3, 4, 5].

#### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение оптимальных условий количественного определения ванкомицина в плазме крови и валидация метода с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС).

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

*Химические вещества и реагенты.* Для приготовления маточных и стандартных растворов ванкомицина и норванкомицина как внутреннего стандарта использовались сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов ванкомицина (Servier, Франция) и норванкомицина (Augsburg, Germany, purity grade >95,0 %), высокоочищенная вода, полученная с помощью системы Milli-Q, муравьиная кислота для ВЭЖХ-МС (Scharlab, Испания), ацетонитрил (Scharlab, Испания).

*Оборудование.* Для взвешивания сухих веществ использовали полумикроаналитические весы Ohaus Explorer EX225/AD. Разделение компонентов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1260 с бинарным насосом и термостатируемым автосемплером. Анализируемые вещества детектировали с помощью гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500. Регистрация хромато-масс-спектров проводилась с использованием программного обеспечения Analyst 1.6. Интеграция пиков, расчет количественного содержания исследуемых соединений и статистическая обработка данных проводилась с помощью программы MultiQuant 2.4.

*Подготовка маточных и стандартных растворов.* Для приготовления маточных и стандартных растворов ванкомицина и норванкомицина использовались сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов веществ, которые впоследствии растворяли в сверхчистой воде. И путем последовательного разведения разводили в смеси ацетонитрил/вода в объемном соотношении 50/50 до достижения концентраций 10; 20; 50; 100; 200; 500 и 1000 мкг/мл.

*Подготовка калибровочных и образцов контроля качества.* Калибровочные образцы готовились в концентрациях 1; 2; 5; 10; 20; 50 и 100 мкг/мл для ванкомицина. Пробоподготовка калибровочных и образцов контроля качества проводилась методом преципитации белков путем добавления к 200 мкл каждой из проб 600 мкл ацетонитрила, последующим центрифугированием в течение 2 минут при 15 000 об./мин и отбором 100 мкл надосадочной жидкости для анализа.

Образцы контроля качества (КК) были приготовлены со следующими четырьмя уровнями концентрации: 1 мкг / мл (НПКО), 7,5 мкг / мл (низкий КК), 35 мкг / мл (средний КК) и 75 мкг / мл (высокий КК).

*Хроматографические и масс-спектрометрические условия.* На хроматографической колонке Poroshell 120 C18 (4,6 × 50 мм, 2,7 мкм) производили разделение компонентов. В данном исследовании подвижная фаза представляла собой смесь вода/ацетонитрил в соотношении 80/20. 0,1%-ю муравьиную кислоту в качестве модификатора добавляли как в водную, так и органическую составляющие мобильной фазы. Разделение компонентов проводили при постоянной температуре 25 °С, которая поддерживалась с помощью специального термостата. Объем вводимой пробы составил 10 мкл. Ионизация исследуемых веществ проводилась методом электроспрея в режиме положительной полярности (ESI – electrospray ionization).

**Валидация.** Валидация разработанного метода проводилась в соответствии с правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза; 2016. – Астана [7].

*Линейность.* Для валидации линейности исследовали калибровочные образцы, которые соответствовали концентрациям: 1; 2; 5; 10; 20; 50 и 100 мкг/мл для ванкомицина. Калибровочные кривые были построены путем построения отношения площадей пиков в зависимости от концентраций в плазме с использованием взвешенной модели линейной регрессии  $1/x^2$ . Нижний предел количественного определения был определен как самая низкая концентрация на калибровочной кривой, которая составила 1 мкг/мл.

Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах  $\pm 15\%$  от номинальных значений (за исключением НПКО, для которых эти значения могут находиться в пределах  $\pm 20\%$ ).

Точность и прецизионность. Внутриведенная точность и прецизионность оценивались путем анализа шести повторностей при трех уровнях концентрации образцов контроля качества для образцов плазмы. Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих нижнему пределу количественного определения (1 мкг/мл), нижнему (7,5 мкг/мл), среднему (35 мкг/мл) и верхнему (75 мкг/мл) уровням концентраций. Анализ образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня.

При этом критерии приемлемости данных должны включать правильность в пределах  $\pm 15\%$  отклонения от номинальных значений и прецизионность в пределах  $15\%$  относительного стандартного отклонения (RSD), за исключением НПКО, где оно не должно превышать  $\pm 20\%$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию

исследуемого вещества. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы разработки методик количественного определения ванкомицина в плазме крови, включая режим детектирования исследуемых веществ и различные способы ионизации аналита [8, 9, 10].

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина включала определения оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции. В качестве метода ионизации был использован электроспрей (ESI). Детекция ионов проводилась в режиме положительной полярности.

Разделение компонентов проводили на хроматографической колонке Poroshell 120 C18. При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомого вещества методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-«предшественники» и соответствующие им ионы-«продукты». Ионы-«предшественники» ванкомицина соответствовали частицам  $m/z$  725,3. Наиболее интенсивными ионами-«продуктами», зарегистрированными при фрагментации протонированных молекул в ячейке соударений, были частицы  $m/z$  88,1 и  $m/z$  387,9 для ванкомицина (рис. 1).

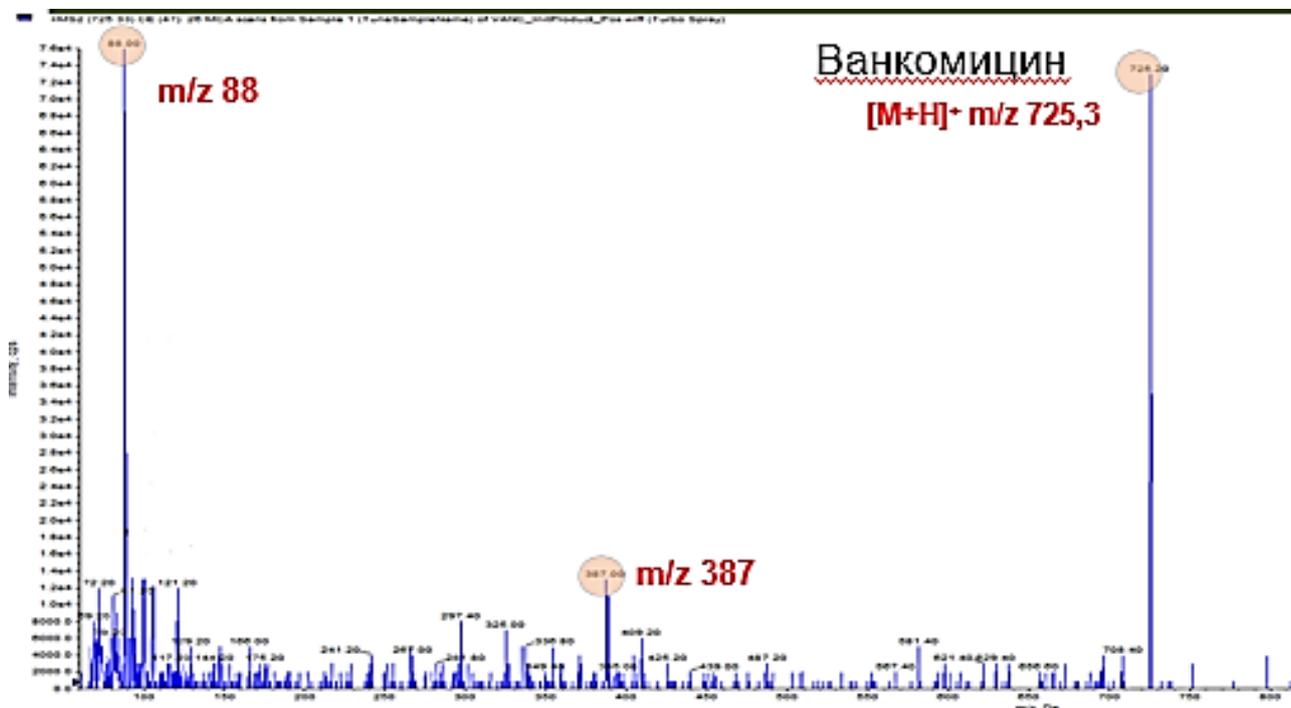


Рис. 1. Масс-спектр ванкомицина в плазме крови: по оси абсцисс – отношение массы к заряду  $m/z$  (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала

В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран изократический режим элюирования. Мобильная фаза состояла из смеси ацетонитрила/воды в соотношении 80/20. В качестве

модификатора мобильной фазы была использована 0,1%-я муравьиная кислота. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин. При этих условиях время удерживания ванкомицина составило 1,63 мин (рис. 2).

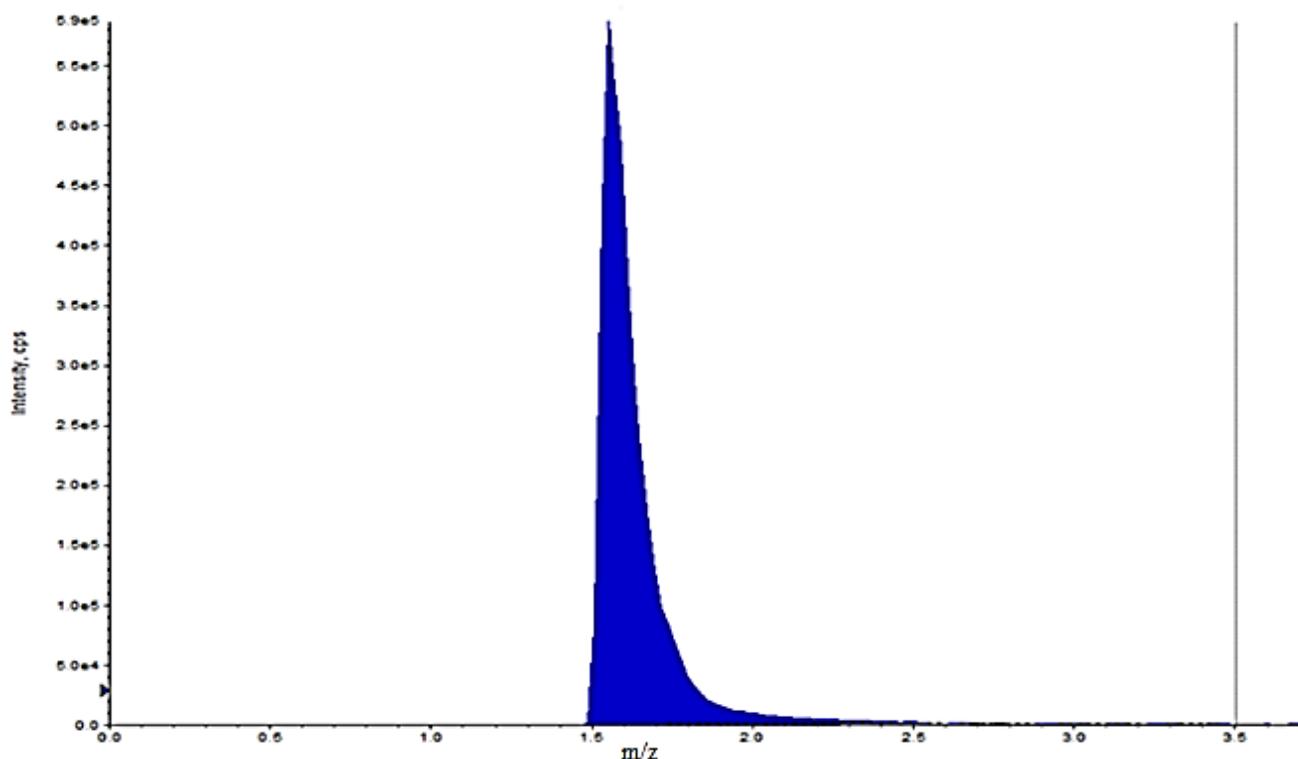


Рис. 2. Хромато-масс-спектрограмма ванкомицина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала

При валидации разработанного метода были установлены основные валидационные параметры: линейность, прецизионность, правильность, чувствительность (нижний предел количественного определения). Разработанная методика подтвердила свою линейность во всем концентрационном диапазоне от 1 до 100 мкг/мл при использовании взвешенного коэффициента  $1/x^2$ , при этом  $r^2 > 0,989$ . Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении

меж- и внутрисуточной правильности не превышал 15 % для основного диапазона концентраций.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, прецизионности и правильности. Нижний предел количественного определения методики составил 1,00 мкг/мл.

Полученные данные валидационных параметров приведены в табл.

Таблица валидационных параметров количественного определения ванкомицина методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием в качестве пробоподготовки преципитации белков

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 мг/мл)	QCL (7,5 мг/мл)	QCM (35 мг/мл)	QCN (75 мг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	3,03	12,2	4,40	6,0
	Между циклами	17,8	13,5	8,03	7,64
Правильность (%)	Внутри цикла	115,0	99,5	93,1	106,6
	Между циклами	110,1	112,7	101,8	100,3
Селективность (%)		3,03	–	–	–
Коэффициент корреляции		0,989			

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании были установлены оптимальные условия количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина в плазме крови человека.

Методика валидирована по всем требованиям Евразийского экономического союза и Европейского агентства по лекарственным средствам и соответствует всем требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 1–100 мкг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики ванкомицина.

Предложенный метод количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина может в дальнейшем использоваться для дальнейшего проведения терапевтического лекарственного мониторинга изучения вариабельности фармакокинетических параметров ванкомицина, что позволит сделать выводы о вкладе отдельных клинико-физиологических и демографических параметров в наблюдаемые межиндивидуальные отличия величины системной экспозиции ванкомицина у новорожденных с диагностированными септическими состояниями, тем самым став отправной точкой для разработки протоколов индивидуализации антибиотикотерапии, учитывающих клинико-лабораторные, демографические и другие параметры, которые необходимо принимать во внимание для обеспечения оптимального режима дозирования.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Терапевтический лекарственный мониторинг ванкомицина у новорожденных: проблемы и перспективы / Б.Е. Толкачев, В.И. Петров, Т.Е. Заячникова [и др.] // *Лечебное дело*. 2021. № 2. С. 17–24.
2. Usman M., Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA) // *SpringerPlus*. 2016. No. 1 (5). P. 1–7.
3. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring / M. Al-Ghazawi [et al.] // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2021. No. 1 (78). P. 3–10.
4. Therapeutic drug monitoring of vancomycin and voriconazole by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method / Y. Li [et al.] // *Chemical Research in Chinese Universities*. 2017. No. 3 (33). P. 339–342.
5. Vancomycin pharmacokinetic model development in patients on intermittent online hemodiafiltration / N. Westra [et al.] // *PLOS ONE*. 2019. No. 5 (14). P. e0216801.

6. Разработка высокочувствительного хромато-масс-спектрометрического метода определения ванкомицина и пиперациллина в плазме крови / И.С. Аникеев, Н.А. Осадченко, П.С. Басаргина [и др.] // *Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов*. 2018. С. 522.

7. Об утверждении правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза; 2016. Астана, 2016. 161 с.

8. Liu M., Yang Z.H., Li G.H. A novel method for the determination of vancomycin in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in patients with diabetic foot infections // *Molecules*. 2018. No. 11 (23). P. 1–12.

9. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: A consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring / K. Matsumoto [et al.] // *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013. No. 3 (19). P. 365–380.

10. An Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Vancomycin Requiring Only 2  $\mu$ L of Rabbit Serum / V. Schmitt [et al.] // *American Journal of Analytical Chemistry*. 2017. No. 09 (08). P. 553–563.

## REFERENCES

1. Tolkahev B.E., Petrov V.I., Zayachnikova T.E. et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin in newborns: problems and prospects. *Lechebnoye delo = Medical business*. 2021;2:17–24. (In Russ.).
2. Usman M., Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). *SpringerPlus*. 2016;1(5):1–7.
3. Al-Ghazawi M. et al. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2021;1(78):3–10.
4. Li Y. et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin and voriconazole by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2017;3(33):339–342.
5. Westra N. et al. Vancomycin pharmacokinetic model development in patients on intermittent online hemodiafiltration. *PLOS ONE*. 2019;5(14):e0216801.
6. Anikeev I.S., Osadchenko N.A., Basargina P.S. et al. Development of a highly sensitive chromat-mass spectrometric method for the determination of vancomycin and piperacillin in blood plasma. *Aktual'nyye problemy eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny materialy 76th mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh i studentov = Actual problems of experimental and clinical medicine materials*

of the 76th international scientific-practical conference of young scientists and students. 2018:522. (In Russ.).

7. On approval of the rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union; 2016. Astana, 2016. 161 p. (In Russ.).

8. Liu M., Yang Z.H., Li G.H. A novel method for the determination of vancomycin in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in patients with diabetic foot infections. *Molecules*. 2018;11(23):1–12.

9. Matsumoto K. et al. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: A consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;3(19):365–380.

10. Schmitt V. et al. An Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Vancomycin Requiring Only 2  $\mu$ L of Rabbit Serum. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2017;09(08):553–563.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

#### *Информация об авторах*

**Владимир Иванович Петров** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии, Волгоградский государственный медицинский университет, главный внештатный специалист – клинический фармаколог Министерства здравоохранения РФ, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0258-4092>, [brain@sprintnet.ru](mailto:brain@sprintnet.ru)

**Иван Сергеевич Аникеев** – заведующий лабораторией фармакокинетики, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9384-4338>, [anikeivan@yandex.ru](mailto:anikeivan@yandex.ru)

**Татьяна Евгеньевна Заячникова** – кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры педиатрии и неонатологии, Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6758-4686>, [guz5deti@mail.ru](mailto:guz5deti@mail.ru)

**Андрей Валерьевич Стрыгин** – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6997-1601>, [drumsav@mail.ru](mailto:drumsav@mail.ru)

**Анна Михайловна Доценко** – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3324-3351>, [ev8278@mail.ru](mailto:ev8278@mail.ru)

**Анна Олеговна Стрыгина** – ассистент кафедры иммунологии и аллергологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7478-2007>, [strygachenok@gmail.com](mailto:strygachenok@gmail.com)

Статья поступила в редакцию 09.09.2022; одобрена после рецензирования 17.11.2022; принята к публикации 06.12.2022.

**The authors declare no conflicts of interests.**

#### *Information about the authors*

**Vladimir I. Petrov** – MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Intensive Care, Volgograd State Medical University, Chief Freelance Specialist – Clinical Pharmacologist of the Ministry of Health of the Russian Federation, Honored Scientist of the Russian Federation, Honored Doctor of the Russian Federation, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0258-4092>, [brain@sprintnet.ru](mailto:brain@sprintnet.ru)

**Ivan S. Anikeev** – Head of the Pharmacokinetics Laboratory, Research Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Assistant of the Department of Fundamental Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9384-4338>, [anikeivan@yandex.ru](mailto:anikeivan@yandex.ru)

**Tatiana E. Zayachnikova** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Pediatrics and Neonatology, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6758-4686>, [guz5deti@mail.ru](mailto:guz5deti@mail.ru)

**Andrey V. Strygin** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Deputy Director, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6997-1601>, [drumsav@mail.ru](mailto:drumsav@mail.ru)

**Anna M. Dotsenko** – Assistant of the Department of Fundamental Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3324-3351>, [ev8278@mail.ru](mailto:ev8278@mail.ru)

**Anna O. Strygina** – Assistant of the Department of Immunology and Allergology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7478-2007>, [strygachenok@gmail.com](mailto:strygachenok@gmail.com)

The article was submitted 09.09.2022; approved after reviewing 17.11.2022; accepted for publication 06.12.2022.