



Ю.С. Транова 
А.В. Шулькин 
И.В. Черных 
П.Ю. Мыльников 
А.А. Слепнев 
Е.Н. Якушева 

Количественный анализ митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС в среде для культивирования клеток Сасо-2

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Высоковольтная, д. 9, Рязань, 390026, Российская Федерация

✉ Черных Иван Владимирович; ivchernykh88@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Митоксантрон — маркерный субстрат белка устойчивости рака молочной железы (BCRP), участвующего в ряде фармакокинетических межлекарственных взаимодействий. При проведении исследований *in vitro* в связи с возможной насыщенностью транспортера BCRP целесообразно применять невысокие концентрации митоксантрона, поэтому необходим высокочувствительный метод его количественного определения.

Цель работы: разработка и валидация методики количественного определения митоксантрона в среде для культивирования клеток Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы: анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» (Thermo Fisher Scientific) с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis и колонкой UCT Selectra C18 4,6×100 мм, 5 мкм, 100 Å. Использовали градиентный режим элюирования, подвижная фаза — смесь раствора муравьиной кислоты 1% и метанола. Скорость подвижной фазы — 0,3 мл/мин, температура разделения — 35 °С, объем пробы — 5 мкл. Длительность анализа — 10 мин, время удерживания митоксантрона — 5,51 мин. Пробоподготовка заключалась в осаждении белка среды для культивирования метанолом и центрифугировании (13000 g, 10 мин). Детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов, метод ионизации — электрораспыление (3700 В), оболочечный газ 50 л/мин, вспомогательный газ 10 л/мин, продувочный газ 1 л/мин, температура трубки для переноса ионов 300 °С, температура испарителя 350 °С. Переходы масс: 455 m/z → 88,2 m/z при энергии столкновения 25 В, 455 m/z → 358,1 m/z при 18 В, фрагментация источника 0, CID газ 2 мТорр.

Результаты: методика характеризовалась селективностью (предел обнаружения — 10 нмоль/л, нижний предел количественного определения — 50 нмоль/л), правильностью, прецизионностью и линейностью (50–1000 нмоль/л). Отсутствовал перенос пробы и матричный эффект, образцы проб обладали стабильностью при моделировании реальных условий хранения. Методика позволяет проводить доклинические исследования влияния лекарственных веществ на активность BCRP путем оценки трансцеллюлярного переноса митоксантрона в присутствии тестируемого вещества.

Выводы: разработана и валидирована ВЭЖХ-МС/МС методика количественного анализа митоксантрона в среде для культивирования клеток Сасо-2.

Ключевые слова: митоксантрон; ВЭЖХ-МС/МС; маркерный субстрат BCRP; валидация; доклинические исследования

Для цитирования: Транова Ю.С., Шулькин А.В., Черных И.В., Мыльников П.Ю., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. Количественный анализ митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС в среде для культивирования клеток Сасо-2. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):104–111. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-449>

Yu.S. Tranova 
A.V. Shchulkin 
I.V. Chernykh 
P.Yu. Mylnikov 
A.A. Slepnev 
E.N. Yakusheva 

Mitoxantrone Quantification by HPLC-MS/MS in Caco-2 Culture Media

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltynaya St., Ryazan 390026, Russian Federation

✉ Ivan V. Chernykh; ivchernykh88@mail.ru

ABSTRACT

Mitoxantrone is a marker substrate of breast cancer resistance protein (BCRP). BCRP is involved in a number of pharmacokinetic drug–drug interactions. The transporter's possible saturability makes it advisable to use low concentrations of mitoxantrone for *in vitro* studies. Consequently, mitoxantrone quantification requires a method with high sensitivity.

The aim of the study was to develop and validate a procedure for mitoxantrone quantification in Caco-2 culture media by HPLC-MS/MS.

Materials and methods. The authors used an Ultimate 3000 HPLC system and a TSQ Fortis triple quadrupole mass spectrometer by Thermo Fisher Scientific and a Selectra C18 column (4.6×100 mm, 5 µm, 100 Å) by United Chemical Technologies. The elution ran in a gradient mode with a mobile phase of 1% formic acid solution and methanol. Experimental parameters were as follows: eluent flow rate, 0.3 mL/min; separation column temperature, 35 °C; injection volume, 5 µL; analysis time, 10 min; approximate mitoxantrone retention time, 5.51 min. The sample preparation involved protein precipitation from the culture medium with methanol, followed by centrifugation at 13,000 g for 10 min. The detection was performed using electrospray ionisation in the positive ion mode. Detection parameters were as follows: electrospray voltage, 3700 V; sheath gas flow rate, 50 L/min; auxiliary gas flow rate, 10 L/min; sweep gas flow rate, 1 L/min; ion-transfer tube temperature, 300 °C; and evaporator temperature, 350 °C. The detection was set at mass transitions of m/z 455 to 88.2 and m/z 455 to 358.1, with the collision energy for these transitions amounting to 25 V and 18 V, respectively. The source fragmentation was at 0, and the CID gas pressure was at 2 mTorr.

Results. The analytical procedure showed selectivity, high sensitivity (limit of detection, 10 nmol/L; lower limit of quantification, 50 nmol/L), accuracy, precision, and linearity in the concentration range of 50–1000 nmol/L. The authors observed no carry-over or matrix effects. A simulation of real-life storage conditions demonstrated high stability of mitoxantrone samples. Thus, the analytical procedure enables preclinical evaluation of medicinal product effects on the functional activity of BCRP, based on assessing the transcellular mitoxantrone transport in the presence of a test product.

Conclusion. The authors developed and validated the analytical procedure for mitoxantrone quantification in Caco-2 culture media by HPLC-MS/MS.

Key words: mitoxantrone; HPLC-MS/MS; BCRP marker substrate; validation; preclinical studies

For citation: Tranova Yu.S., Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Mylnikov P.Yu., Slepnev A.A., Yakusheva E.N. Mitoxantrone quantification by HPLC-MS/MS in Caco-2 culture media. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):104–111. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-449>

Введение

Митоксантрон — синтетическое противоопухолевое средство, производное антрацендиона, применяемое для терапии рака молочной железы и простаты, лимфомы и лейкемии. Основной механизм действия препарата заключается в ингибировании фермента топоизомеразы II, необходимого для процесса репарации ДНК [1].

Одним из новых методов доклинического исследования лекарственных средств является изучение их взаимодействий на уровне мембранных белков-транспортеров *in vitro*. В соответствии с руководствами зарубежных регуляторных органов¹ и отечественными рекомендациями² все новые лекарственные вещества необходимо тестировать на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белков-транспортеров.

¹ *In vitro* metabolism and transporter-mediated drug–drug interaction studies. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2017.

² Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.

Митоксантрон является субстратом эффлюксного мембранного белка устойчивости рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP), который препятствует всасыванию препарата в кишечнике и проникновению в опухолевые клетки, а также способствует экскреции препарата гепатобилиарной системой. BCRP — продукт экспрессии гена *ABCG2*, эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортер, впервые обнаруженный в 1998 г. в клетках рака молочной железы (линия MCF-7/AdrVp), которые не содержали гликопротеина-P (ABCB1-белок) и транспортера MRP1, но проявляли множественную лекарственную устойчивость [2]. Транспортер экспрессируется также в синцитиотрофобластах плаценты человека и в меньшей степени на апикальной мембране эпителия тонкой кишки, на капиллярной поверхности гепатоцитов, в эндотелиоцитах гематоэнцефалического барьера, в стволовых клетках, в яичниках, надпочечниках и легких [3]. Такая локализация белка в тканях, а также принадлежность к числу его субстратов широкого спектра лекарственных веществ (противоопухолевые агенты, производные нуклеозидов и нуклеотидов, препараты стероидных гормонов, ряд антибиотиков и пр. [4]) свидетельствует о его активном влиянии на фармакокинетику лекарственных средств [5]. Вариабельность активности BCRP, продемонстрированная в многочисленных исследованиях, повышает вероятность возникновения межлекарственных фармакокинетических взаимодействий с его участием.

Митоксантрон является маркерным субстратом BCRP, т.е. препаратом, фармакокинетика которого существенно зависит от функционирования транспортера. Таким образом, интенсивность переноса вещества через клеточный монослой может служить показателем активности BCRP. Определение активности белков-транспортеров путем оценки трансцеллюлярного переноса их маркерных субстратов или анализа их фармакокинетики было одобрено, например, для оценки влияния лекарственных средств на ABCB1-белок соответственно *in vitro* и *in vivo*³ [6, 7]. В связи с тем что опыты *in vitro* требуют меньших временных и экономических затрат, а также не сопряжены с этическими проблемами, они являются предпочтительными для исследования влияния биологически активных веществ на активность транспортных белков.

Оценка интенсивности переноса митоксантрона через билипидную мембрану клеток, гиперэкспрессирующих BCRP, например, доступной в России линии клеток Caco-2 [5], позволит

не только определять принадлежность тестируемых веществ к его субстратам или модуляторам и прогнозировать нежелательные межлекарственные взаимодействия, но также проводить направленный поиск веществ-ингибиторов данного транспортера с целью их дальнейшего использования для повышения эффективности химиотерапии рака молочной железы.

В опытах *in vitro* целесообразно применять невысокие концентрации митоксантрона, что связано с возможной насыщаемостью транспортера BCRP. Поэтому необходим высокочувствительный метод количественного определения митоксантрона. Широко распространенным методом анализа лекарственных веществ в биологических жидкостях является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Однако этот метод имеет ряд существенных недостатков: относительно низкую разрешающую способность и специфичность, длительность анализа, необходимость использования сложной и дорогостоящей экстракции для пробоподготовки [8]. Ранее с использованием более чувствительного и селективного метода — ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) была разработана методика количественного анализа метотрексата — еще одного субстрата BCRP — в среде для культивирования клеток Caco-2 [9]. Митоксантрон имеет важное преимущество: отношение коэффициентов кажущейся проницаемости данного вещества в трансвелл-системе ($6,18 \pm 0,17$) — параметр, характеризующий степень участия белка-транспортера в его трансцеллюлярном переносе — превышает отношение тех же коэффициентов метотрексата ($3,38 \pm 0,08$). Это делает митоксантрон более предпочтительным для использования в качестве маркера функционирования BCRP.

Цель работы — разработать и валидировать методику количественного анализа митоксантрона (маркерного субстрата BCRP) в среде для культивирования клеток Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы

В качестве стандартного образца использовали субстанцию митоксантрона (Sigma Aldrich, кат. № MKCM8540). Матричный раствор митоксантрона в метаноле с концентрацией 1 мг/мл ($2,27 \times 10^6$ нмоль/л) хранили при температуре -20°C . Рабочие растворы (с концентрациями 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 и 10000 нмоль/л) готовили из матричного раствора путем

³ Clinical drug interaction studies — Cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2020.

его разбавления в среде для культивирования, представляющей собой раствор Хэнкса (ООО «ПанЭко», кат. № P020п) с 25 мМ HEPES (Gibco, кат. № 2026999) и 1% диметилсульфоксида (ООО «ПанЭко», кат. № Ф135). Калибровочные растворы (с концентрациями 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нмоль/л митоксантрона) и образцы для контроля качества (с концентрациями 50, 150, 400 и 800 нмоль/л митоксантрона) готовили разведением равных объемов рабочих растворов средой для культивирования, получаемой после инкубации с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч (клетки могут выделять в среду ряд высокомолекулярных соединений, способных повлиять на результаты анализа). Готовили три серии калибровочных растворов и растворов контроля качества, одна серия составляла один валидационный цикл. Аналитический диапазон выбирали на основе концентраций, ожидаемых в исследовании на указанной клеточной линии.

Количественный анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Fisher), оснащенном автосемплером, дегазатором, градиентным насосом и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis (Thermo Fisher).

Управление системой и математическую обработку данных проводили с помощью программы Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47).

Использовали обращенно-фазовую хроматографическую колонку UCT Selectra C18 4,6×100 мм, 5 мкм, 100 Å (United Chemical Technologies) и предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM (United Chemical Technologies).

Использовали градиентный режим элюирования смесью раствора муравьиной кислоты и метанола (табл. 1). Скорость подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин при температуре 35 °С, объем вводимой пробы – 5 мкл.

Время одного анализа составляло 10 мин, время удерживания митоксантрона соответствовало 5,51±0,013 мин. Для приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: вода для ВЭЖХ-МС (VWR, кат. № 21F104014), кислота муравьиная 98% (Panreac, кат. № 0001900259), метанол квалификации «ос.ч.» для градиентной ВЭЖХ (ООО ТД «Химмед»).

Анализ проводили в режиме регистрации положительных ионов, метод ионизации – электрораспыление, напряжение на игле распылителя 3700 В; скорость потока оболочечного газа (sheath gas) составляла 50 л/мин, вспомогательного газа (auxiliary gas) – 10 л/мин, продувочного газа (sweep gas) – 1 л/мин, температура трубки для переноса ионов – 300 °С, температура испарителя – 350 °С. Для детектирования митоксантрона использовали следующие переходы масс: 455 m/z → 88,2 m/z при энергии столкновения 25 В и 455 m/z → 358,1 m/z при энергии столкновения 18 В, фрагментация источника 0, CID gas 2 мТорр.

Пробоподготовка заключалась в осаждении белка и других высокомолекулярных веществ (которые могут присутствовать в среде для культивирования после инкубации с клетками) метанолом. Для этого к 100 мкл пробы добавляли 400 мкл метанола, перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph), центрифугировали на центрифуге Avanti JXN-3 (Beckman Coulter) при 13000 g в течение 10 мин.

Для расчета метрологических характеристик и основных валидационных параметров разработанной методики применяли программы Statistica 13.0 и Microsoft Excel.

Биоаналитическую методику валидировали по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), матричный эффект, перенос пробы и стабильность образцов в соответствии с действующими отечественными и зарубежными руководствами⁴.

Таблица 1. Программа градиентного элюирования для анализа митоксантрона

Table 1. Gradient elution programme for mitoxantrone analysis

Время анализа, мин Time, min	Соотношение компонентов подвижной фазы по объему, %: Volume ratio of mobile phase components, %:	
	раствор муравьиной кислоты 1 % 1% formic acid solution	метанол methanol
0	70	30
0,3	10	90
6	70	30

⁴ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.
Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».
Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London; 2011.

Результаты и обсуждение

Основным аналитическим методом, используемым при изучении фармакокинетики лекарственных веществ для оценки их концентрации в биожидкостях, является ВЭЖХ. При этом универсальным и наиболее селективным методом детектирования стала tandemная масс-спектрометрия (МС/МС) [10]. Для митоксантрона ранее предложена методика количественного анализа данным методом с УФ-детектированием [11], что снижает ее специфичность, а также требует значительного увеличения объема вводимого образца. Использование флуоресцентного детектора для митоксантрона затруднительно в связи с его низкой флуоресцирующей способностью [12].

Селективность разработанной нами методики определяли, анализируя холостую пробу среды для культивирования без добавления стандарта митоксантрона и образцы среды для культивирования с добавлением митоксантрона до конечных концентраций 50, 150, 400 и 800 нмоль/л. На хроматограммах образцов холостой среды для культивирования не наблюдали пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания целевого вещества (рис. 1).

Предел обнаружения митоксантрона в среде для культивирования составил 10 нмоль/л, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой

линии) превышало 3. Нижний предел количественного определения митоксантрона составил 50 нмоль/л. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%.

Калибровочную кривую строили, анализируя 7 калибровочных растворов (образцов холостой среды для культивирования с добавлением растворов митоксантрона до получения концентраций 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нмоль/л). Полученные калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации вещества (образец одного из графиков приведен на рисунке 2) могут быть экстраполированы следующими уравнениями линейной регрессии: $y = -133,844 + 8,395 \times x$, коэффициент корреляции $r = 0,9986$; $y = -217,449 + 9,438 \times x$, $r = 0,9987$, $W = 1/x$; $y = -289,597 + 9,62134 \times x$, $r = 0,9989$, $W = 1/x$. Полученные коэффициенты корреляции соответствовали рекомендованным значениям (не менее 0,99)⁵.

Отклонения найденных концентраций калибровочных образцов от номинальных значений, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, приведены в таблице 2 и демонстрируют близость каждой точки к калибровочной кривой. Экспериментально рассчитанные концентрации калибровочных растворов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением концентрации, соответствующей нижнему пределу количественного определения, для которой эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$)⁶.

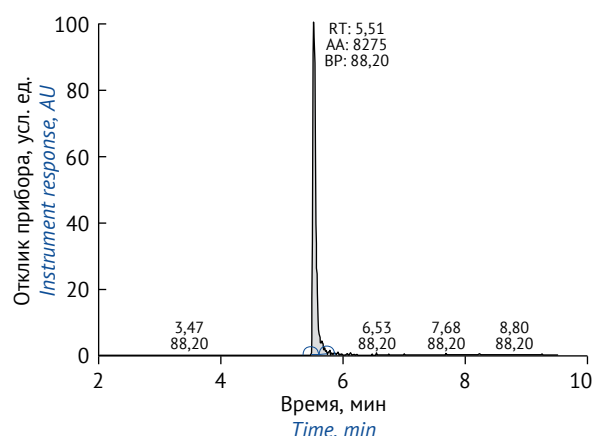


Рис. 1. Хроматограмма среды для культивирования с добавлением 1000 нмоль/л митоксантрона (RT – retention time, время удерживания; AA – automatic area, площадь пика; BP – base peak, молекулярная масса основного продукта распада молекулярного иона)

Fig. 1. Chromatogram of the culture medium with 1000 nmol/L mitoxantrone (RT, retention time; AA, automatic area measurement; BP, base peak representing the molecular weight of the main product of molecular ion decay)

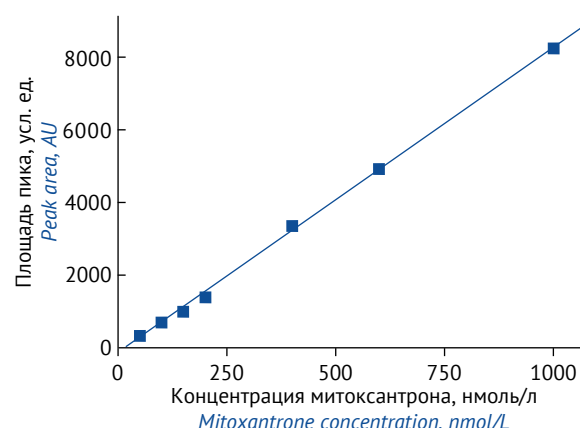


Рис. 2. Образец калибровочного графика зависимости «концентрация митоксантрона – площадь пика»

Fig. 2. Exemplar calibration curve of mitoxantrone concentration versus peak area

⁵ Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2018.

⁶ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Правильность и прецизионность методики оценивали, выполняя анализ образцов для контроля качества митоксантрона с концентрациями 50, 150, 400 и 800 нмоль/л в рамках трех циклов, параметры оценивали внутри и между циклами. Полученные величины прецизионности

(относительного стандартного отклонения) и правильности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (табл. 3 и 4).

Таблица 2. Отклонения вычисленных концентраций митоксантрона в калибровочных растворах от номинальных значений

Table 2. Deviations of mitoxantrone concentrations in calibration samples from their nominal values

Концентрация митоксантрона номинальная, нмоль/л <i>Nominal mitoxantrone concentration, nmol/L</i>	Серия калибровочных растворов 1 <i>Set of calibration solutions 1</i>		Серия калибровочных растворов 2 <i>Set of calibration solutions 2</i>		Серия калибровочных растворов 3 <i>Set of calibration solutions 3</i>	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л <i>Calculated concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>	Концентрация рассчитанная, нмоль/л <i>Calculated concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>	Концентрация рассчитанная, нмоль/л <i>Calculated concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>
50,0	56,23	12,47	44,20	11,61	50,86	1,71
100,0	99,38	0,62	90,74	9,26	96,52	3,49
200,0	182,99	8,50	204,60	2,30	208,21	4,10
400,0	415,99	4,00	418,81	4,70	418,35	4,59
600,0	606,65	1,11	618,63	3,11	614,36	2,39
800,0	697,56	12,88	819,24	2,40	811,15	1,39
1000,0	1001,67	0,17	967,64	3,24	956,74	4,32

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики количественного определения митоксантрона в среде для культивирования клеток Сасо-2 внутри цикла и между циклами

Table 3. Intra- and inter-run accuracy and precision of the analytical procedure for mitoxantrone quantification in Caco-2 culture media

Уровень концентрации митоксантрона, нмоль/л <i>Mitoxantrone concentration, nmol/L</i>	Параметр <i>Parameter</i>	Результаты определения концентрации митоксантрона (диапазон / среднее арифметическое) <i>Mitoxantrone concentration measurement results (range / arithmetic mean)</i>
50 150 400 800	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>	13,19–18,22 / 14,92 3,95–4,96 / 4,42 7,74–10,87 / 8,83 4,14–5,89 / 4,76
50 150 400 800	Прецизионность, % <i>Precision, %</i>	11,72–16,13 / 13,76 3,18–6,10 / 5,72 6,93–9,32 / 8,34 5,42–6,88 / 5,98

Таблица 4. Правильность при определении стабильности растворов митоксантрона с концентрациями 150 и 800 нмоль/л

Table 4. Accuracy observed in the stability study of 150 nmol/L and 800 nmol/L mitoxantrone solutions

Условия хранения <i>Storage conditions</i>	Концентрация номинальная, нмоль/л <i>Nominal concentration, nmol/L</i>	Концентрация рассчитанная средняя, нмоль/л <i>Calculated average concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>
При комнатной температуре <i>Room temperature</i>	150,00	143,44	4,37
	800,00	793,87	0,77
Трехкратная заморозка-разморозка при –80 °С <i>Three freeze-thaw cycles at –80 °C</i>	150,00	148,11	1,26
	800,00	786,24	1,72
Хранение при –80 °С в течение 60 сут <i>Storage at –80 °C for 60 days</i>	150,00	137,40	8,40
	800,00	764,32	4,46
После пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч <i>Sample preparation and 24 h in the autosampler</i>	150,00	156,07	4,04
	800,00	776,60	2,92

Матричный эффект оценивали по площади пиков митоксантрона с концентрациями 50 и 800 нмоль/л в растворах со средой для культивирования и в метаноле. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, отобранной из 6 отдельных лунок планшета, не превышало 15%.

Стабильность растворов митоксантрона с концентрациями 150 и 800 нмоль/л в среде для культивирования анализировали при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратной заморозке-разморозке при -80°C , при хранении при -80°C в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч. Выполняли по 3 повтора для каждого вида стабильности. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений (табл. 4).

При последовательном анализе пробы с концентрацией митоксантрона 1000 нмоль/л и холостой пробы (образец среды для культивирования) на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени

удерживания пикам митоксантрона, т.е. переноса проб не происходило.

Заключение

Разработанная ВЭЖХ-МС/МС методика количественного определения митоксантрона (маркерного субстрата BCRP) в среде для культивирования клеток Caco-2 обладает более высокой специфичностью и разрешающей способностью, позволяет проводить более быструю пробоподготовку и количественный анализ проб по сравнению с ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Данная методика валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность, прецизионность, матричный эффект, перенос пробы и стабильность. Полученный аналитический диапазон позволяет использовать методику для определения концентрации митоксантрона при оценке его транспорта через монослой клеток линии Caco-2 с целью анализа тест-веществ на принадлежность к модуляторам активности белка-транспортера BCRP.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;31(5):CD002127. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002127.pub3>
2. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(26):15665–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
3. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001;61(8):3458–64. PMID: 11309308
4. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport – an update. *AAPS J*. 2015;17(1):65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
5. Kawahara I, Nishikawa S, Yamamoto A, Kono Y, Fujita T. The impact of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab Dispos*. 2020;48(6):491–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.088674>
6. Ерохина, ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Попова НМ, Сlepnev AA, Якушева ЕН. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р in vitro. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020;28(2):135–42.
7. Ерохина, ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Котлярова АА, Правкин СК и др. Влияние эстрадиола на активность гликопротеина-Р in vitro. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329–36.
8. Ерохина ПД, Абаленихина ЮВ, Шchulkin AV, Chernykh IV, Kotlyarova AA, Pravkin SK, et al. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein in vitro. *Science of the Young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329–36 (In Russ.). <https://doi.org/10.23888/HMJ202083329-336>
9. Zhang P, Ling G, Sun J, Sun Y, Pu X, Wang Z, He Z. Determination of mitoxantrone in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(24):2260–5. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.06.016>
10. Мыльников ПЮ, Транова ЮС, Шулькин АВ, Якушева ЕН. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):45–51.
11. Mylnikov PYu, Tranova YuS, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in

- a transport medium by HPLC-MS/MS. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2021;(1):45–51 (In Russ.).
<https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-45-51>
10. Hsieh Y. HPLC-MS/MS in drug metabolism and pharmacokinetic screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(1):93–101.
<https://doi.org/10.1517/17425255.4.1.93>
11. Tietze R, Schreiber E, Lyrer S, Alexiou C. Mitoxantrone loaded superparamagnetic nanoparticles for drug targeting: a versatile and sensitive method for quantification of drug enrichment in rabbit tissues using HPLC-UV. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:597304.
<https://doi.org/10.1155/2010/597304>
12. Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Remião F. Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules*. 2017;22(4):600.
<https://doi.org/10.3390/molecules22040600>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Ю.С. Транова — выполнение хроматографических исследований, пробоподготовка; А.В. Шулькин — статистическая обработка полученных результатов, написание текста рукописи; И.В. Черных — выполнение хроматографических исследований, расчет валидационных параметров; П.Ю. Мыльников, А.А. Слепнев — выполнение хроматографических исследований; Е.Н. Якушева — написание и редактирование текста рукописи, общее руководство работой.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Е.Н. Якушева является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Yuliya S. Tranova carried out chromatographic analyses and sample preparation. Alexey V. Shchulkin performed statistical analysis of the obtained results and drafted the manuscript. Ivan V. Chernykh carried out chromatographic analyses and calculated validation parameters. Pavel Yu. Mylnikov, Aleksandr A. Slepnev carried out chromatographic analyses. Elena N. Yakusheva drafted and edited the manuscript and coordinated the study.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. Elena N. Yakusheva is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*; the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Транова Юлия Сергеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>
yulyatran@gmail.com

Шулькин Алексей Владимирович, д-р мед. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
alekseyshulkin@rambler.ru

Черных Иван Владимирович, канд. биол. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>
ivchernykh88@mail.ru

Мыльников Павел Юрьевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
dukeviperlr@gmail.com

Слепнев Александр Александрович, канд. биол. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0696-6554>
a.slepnev@rzgmu.ru

Якушева Елена Николаевна, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
e.yakusheva@rzgmu.ru

Yuliya S. Tranova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>
yulyatran@gmail.com

Aleksey V. Shchulkin, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
alekseyshulkin@rambler.ru

Ivan V. Chernykh, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>
ivchernykh88@mail.ru

Pavel Yu. Mylnikov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
dukeviperlr@gmail.com

Aleksandr A. Slepnev, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0696-6554>
a.slepnev@rzgmu.ru

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
e.yakusheva@rzgmu.ru

Статья поступила 18.04.2022

После доработки 23.09.2022

Принята к печати 21.11.2022

Online first 31.01.2023

Received 18 April 2022

Revised 23 September 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 31 January 2023