

На правах рукописи



Леонов Клим Андреевич

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2017

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

- Научный руководитель:** доктор химических наук, профессор,
Бакибаев Абдигали Абдиманатович
- Официальные оппоненты:** **Ефремов Александр Алексеевич**
доктор химических наук, профессор,
ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Политехнический институт,
кафедра химии, профессор
- Рогачев Артем Дмитриевич**
кандидат химических наук, ФГБУН
«Новосибирский институт органической химии имени Н. Н. Ворожцова» СО РАН,
лаборатория физиологически активных веществ, научный сотрудник
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита состоится 7 февраля 2018 г. в 14.30 час. на заседании диссертационного совета Д.212.269.04 при ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ, малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 53а и на сайте <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>

Автореферат разослан « » декабря 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д.212.269.04



Т.М. Гиндуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В современном лечении раковых заболеваний крови и кожи важное место занимает химиотерапия, обеспечивающая подавление роста опухолевых клеток и усиление процесса их естественной гибели. Лучшим из таргетных (целевых) препаратов, применяемых при меланоме и миелолейкозе, является иматиниб. Он впервые был разработан компанией Novartis и реализуется под торговым наименованием Гливек[®], объемы продаж которого на рынке России составляют более чем 150 млн долларов США в год. Иматиниб включен в Список стратегически значимых лекарственных средств и входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП). В связи с тем, что одной из важнейших задач Стратегии развития фармацевтической промышленности до 2020 г является импортозамещение лекарственных средств, в том числе иматиниба, а также с истечением срока патентной защиты на производство Гливек[®] и большим объемом рынка его продаж, этот препарат представляет интерес для отечественных производителей дженериков.

Для государственной регистрации в РФ воспроизведенного лекарственного препарата на основе иматиниба согласно Российскому законодательству необходимо подтверждение его эффективности и безопасности оригинальному препарату, которое устанавливается путем клинического исследования биоэквивалентности. Обязательным этапом на пути проведения такого исследования является разработка биоаналитической методики определения лекарственного средства в плазме крови человека с предварительным подбором условий выделения исследуемого вещества из биологической среды.

В качестве методов определения иматиниба в плазме крови применяют ВЭЖХ с УФ-детектированием и ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Использование высокочувствительного метода ВЭЖХ/МС весьма затруднительно, ввиду высокой стоимости оборудования. Преимуществами ВЭЖХ-УФ метода являются простота и доступность, что делает его незаменимым в большинстве фармакокинетических исследований.

Существующий ряд отечественных и зарубежных методик определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием не отвечает должным образом поставленным задачам, в частности, чувствительность таких методик не превышает 50 нг/мл. В большинстве случаев на получаемых хроматограммах наблюдаются широкие и асимметричные пики иматиниба, что свидетельствует о недоработке методики или отсутствии оптимизации хроматографических условий. Помимо этого, в процессе применяемых методов пробоподготовки происходит перенос эндогенных веществ матрицы в анализируемую пробу, что отражается наличием большого числа посторонних пиков на хроматограммах и, следовательно, потерей разрешения между пиками и специфичности анализа. В связи с этим возникает необходимость создания

новой более чувствительной биоаналитической методики определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ с обоснованным выбором условий анализа и условий пробоподготовки.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение хроматографического поведения иматиниба и разработка новой методики его количественного определения в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- оценить влияние модификаторов подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба;
- разработать хроматографические условия для количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием;
- разработать методику пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба;
- валидировать разработанную методику хроматографического определения иматиниба в плазме крови человека и рассчитать метрологические характеристики;
- провести анализ образцов плазмы крови добровольцев, содержащих иматиниб, в клиническом исследовании биоэквивалентности.

Научная новизна.

1. Предложен новый состав подвижной фазы для хроматографического определения иматиниба в плазме крови человека. Установлено, что разработанный состав динамически модифицированной подвижной фазы А и Б способствует уменьшению размывания хроматографической зоны иматиниба и получению на хроматограммах его узкого и симметричного пика.

2. Впервые разработаны хроматографические условия определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием, способствующие снижению его нижнего предела количественного определения до 40 % по сравнению с известными.

3. Предложен новый способ пробоподготовки образцов плазмы крови человека методом жидкостно-жидкостной экстракции ацетонитрилом по принципу QuEChERS для хроматографического определения иматиниба. Благодаря данному способу увеличена степень извлечения иматиниба из плазмы крови человека до 92 % и увеличена селективность его определения.

4. Разработан алгоритм пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба.

Практическая значимость работы. Разработана новая биоаналитическая методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Данная методика не требует дорогостоящих реактивов и позволяет быстро получать результаты с требуемой правильностью и прецизионностью, что очень важно для практического применения в медицинских целях. Разработанная

методика внедрена в практику работы Лаборатории аналитической химии Отдела фармацевтических разработок ООО «Ифар» (г. Томск, Россия) для различных фармакокинетических исследований иматиниба, в том числе исследований биоэквивалентности его препаратов.

С помощью разработанной методики проведено сравнение воспроизведенного препарата ИМВ, капсулы 100 мг и оригинального препарата Гливек[®], капсулы 100 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) в клиническом исследовании их биоэквивалентности. На основании полученных результатов анализа рассчитаны важнейшие фармакокинетические параметры, позволяющие судить о всасывании, распределении и выведении лекарственного средства. Благодаря проведенному исследованию воспроизведенный лекарственный препарат зарегистрирован Минздравом РФ и выведен на рынок под названием Иглиб[®], капсулы 100 мг (ЗАО «ФармФирма Сотекс», Россия).

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Результаты оценки влияния модификаторов подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба.
- 2) Хроматографические условия для количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.
- 3) Методика пробоподготовки образцов плазмы крови человека методом жидкостно-жидкостной экстракции ацетонитрилом по принципу QuEChERS для хроматографического определения иматиниба.
- 4) Результаты валидации разработанной методики хроматографического определения иматиниба в плазме крови человека и расчета метрологических характеристик.
- 5) Результаты анализа образцов плазмы крови добровольцев в клиническом исследовании биоэквивалентности препаратов иматиниба.

Апробация результатов работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на Международной научно-практической конференции «Интеграция науки, образования и производства – основа реализации Плана нации (Сагиновские чтения № 7)» (Караганда, Казахстан, 2015), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016 (Новосибирск, 2016), XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулева, посвященной 120-летию Томского политехнического университета «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2016), X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Барнаул, 2016), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016).

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнялись в сотрудничестве с коллективом Лаборатории аналитической химии Отдела фармацевтических разработок ООО «Ифар» (г. Томск, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад автора. Основные экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Автором выполнены исследования по разработке и валидации биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ, разработаны хроматографические условия и условия пробоподготовки для извлечения иматиниба из биологической матрицы. Проведен анализ образцов плазмы крови добровольцев после приема тестируемого и референтного препаратов в клиническом исследовании биоэквивалентности, рассчитаны фармакокинетические параметры и проведена их статистическая обработка. Автором проведено обобщение всех полученных результатов и формулирование выводов.

Структура и объём работы: Диссертационная работа выполнена на 116 страницах машинописного текста и включает 32 рисунка, 29 таблиц и список литературы из 115 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, обоснован подход к достижению поставленной цели.

Первая глава представляет собой обзор литературы по истории открытия иматиниба, его свойствам, методам и условиям его извлечения из биологической среды и количественного определения в плазме крови человека. Показано, что известные методики отечественных и зарубежных авторов обладают низкой чувствительностью (50 нг/мл) и селективностью, а степень извлечения в результате применяемых методов пробоподготовки не превышает 84 %, что создает необходимость разработки новой более чувствительной методики с обоснованным выбором условий анализа и пробоподготовки.

Во второй главе приведены основные методы и условия экспериментов, материалы, реактивы и оборудование, используемые в исследовании.

Основным объектом исследования является фармацевтическая субстанция иматиниба мезилата $C_{29}H_{31}N_7O \cdot CH_2SO_3H$, которую использовали в процессе разработки и валидации методики.

Хроматографическое определение иматиниба в плазме крови человека проводили на жидкостном хроматографе Милихром А-02 (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия), снабженном двухшприцевым градиентным насосом, автоматическим автодозатором, твердотельным электрическим термостатом колонки и двухлучевым УФ-детектором. Разделение проводили на колонке ProntoSIL 120-5-C₁₈ AQ, размером

75 × 2 мм, заполненной октадецил-модифицированным силикагелем с размером зерна сорбента 5 мкм. Запуск анализа и сбор данных выполняли при помощи программного обеспечения Милихром А-02 (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия), обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения «Мультихром» (ЗАО «Амперсенд», Россия).

Запись УФ-спектра раствора субстанции и определение максимумов и минимумов их поглощения проводили на УФ/вид-спектрофотометре Lambda 14P (Perkin Elmer, Германия) в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см в диапазоне длин волн 190-400 нм.

Для контроля pH подвижной фазы использовали лабораторный pH-метр-милливольтметр pH-410 (ЗАО «Аквилон», Россия). Значение pH контролировали лабораторным комбинированным стеклянным электродом общего назначения ЭСЛК-01.7 (ЗАО «Аквилон», Россия).

Взвешивание точных навесок фармацевтической субстанции иматиниба мезилата и реактивов для приготовления подвижной фазы проводили на лабораторных электронных аналитических весах ЛВ 210-А (ЗАО «Сартогосм», Россия).

В исследовании также применяли следующее вспомогательное оборудование: лабораторный медицинский встряхиватель Vortex V-3 (Elmi, Латвия), настольную лабораторную микроцентрифугу Biofuge pico (Heraeus, Германия), вакуумный концентратор UniEquip 100 ECH (Univapo, Германия), аквадистиллятор электрический АЭ-10МО (ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия), ультразвуковую мойку Elmasonic S 130 H (Elma, Германия), низкотемпературный морозильник MDF-U5386S (Sanyo, Япония).

Условия разработки методики хроматографического определения иматиниба в плазме крови человека

Оценка влияния состава подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба заключалась в поэтапном изменении модификаторов в составе подвижной фазы и определении основных хроматографических характеристик пика иматиниба: времени удерживания, ширины, фактора асимметрии и эффективности разделения.

Разработку условий хроматографического анализа проводили, осуществляя выбор состава подвижной фазы, скорости потока элюентов, условия градиентного режима элюирования, объема ввода пробы для получения на хроматограмме пика иматиниба с оптимальными значениями параметров его хроматографического пика. Выбранные условия применяли для определения иматиниба в биологических образцах.

Условия пробоподготовки подбирали с учетом разработанных параметров хроматографического анализа, необходимой специфичности анализа, а также важнейшего параметра – степени извлечения вещества. Изменяли варьируемые параметры (pH, количество экстрагента, скорость и время экстракции) для получения максимальной степени извлечения

иматиниба из плазмы крови человека. Выбор оптимальных условий пробоподготовки проводили с помощью модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл.

Валидация методики

Проводили валидацию разработанной методики на основании «Руководства по экспертизе лекарственных средств. Том 1» (Россия, 2013) и согласно требованиям руководств по валидации «Guideline on validation of bioanalytical methods» (EMA, Англия, 2009) и «Guidance for Industry: Bioanalytical method validation» (FDA, США, 2001) по следующим параметрам:

- специфичность;
- предел обнаружения;
- нижний предел количественного определения;
- линейность;
- правильность;
- повторяемость;
- внутрилабораторная прецизионность;
- стабильность;
- перенос;
- надежность (устойчивость).

Условия анализа образцов плазмы крови добровольцев в клиническом исследовании биоэквивалентности препаратов иматиниба

Объектами клинического исследования биоэквивалентности являлись воспроизведенный препарат – ИМВ (кодовое название), капсулы 100 мг (Россия) (тест-препарат – Т) и оригинальный препарат – Гливек[®], капсулы 100 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) (референс-препарат – R).

Добровольцами через 30 мин после приема пищи осуществлялся прием 4 капсул (400 мг) одного из препаратов. Отбор проб крови у добровольцев проводили через 30 мин и 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 ч с помощью катетера, через 24, 48 и 72 ч путем венопункции. Через 14 дней по аналогичной схеме проводили второй период исследования.

Анализ образцов плазмы крови добровольцев выполняли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием согласно ранее разработанной и валидированной биоаналитической методике количественного определения иматиниба в плазме крови человека. Количественное содержание иматиниба в образцах плазмы крови добровольцев определяли по градуировочному графику.

Индивидуальные фармакокинетические профили изменения концентраций (C) иматиниба в плазме крови добровольца во времени (t), зарегистрированные после приема препаратов ИМВ и Гливек[®], характеризовали максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max}) и временем достижения максимальной концентрации (T_{max}), а также площадью под кривой «концентрация – время» в пределах от нуля до

момента последнего отбора пробы крови ($t=72$ ч), рассчитанной методом трапеций (AUC_{0-72}).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета Microsoft Office Excel 2013 в соответствии с Методическими указаниями «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» (Москва, 2008).

В третьей главе обсуждаются результаты по оценке влияния модификаторов подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба и выбору условий хроматографического анализа и пробоподготовки.

Для выбора рабочей длины волны спектрофотометрического детектора проводили запись УФ-спектра водного раствора субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 0,05 мг/мл. Полученный УФ-спектр представлен на рисунке 1.

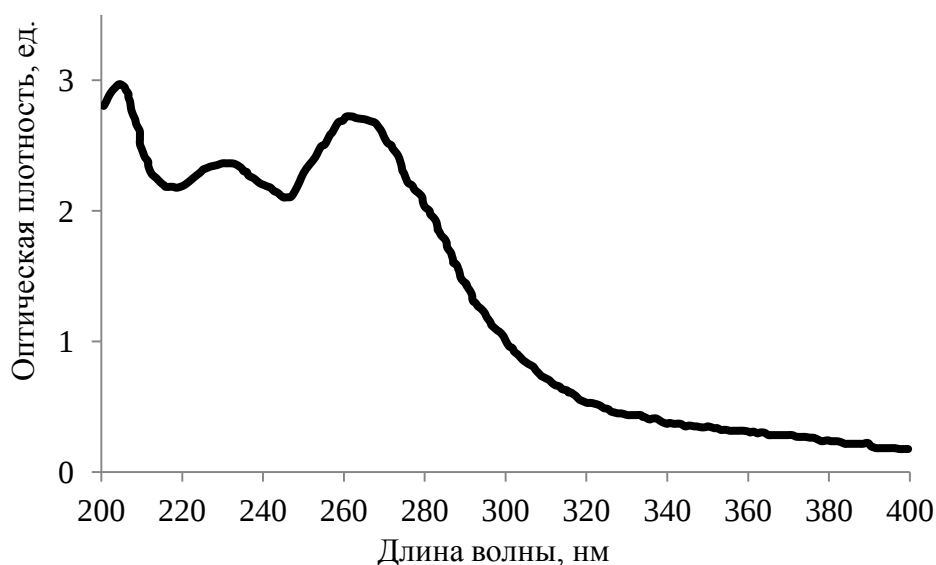


Рисунок 1 – УФ-спектр раствора субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 0,05 мг/мл

В качестве рабочей длины волны УФ-детектора жидкостного хроматографа использовали длину волны 260 нм, отвечающую наибольшей интенсивности поглощения на УФ-спектре раствора субстанции.

Оценку влияния модификаторов подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба и разработку условий хроматографического анализа проводили параллельно с помощью раствора субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл. Хроматографическое разделение проводили при ступенчато-градиентом режиме элюирования. Температура колонки составляла 35 °С, скорость потока стандартная для колонки таких размеров – 0,1 мл/мин. При таком значении скорости потока обеспечивались приемлемые значения давления в системе и времени анализа. Объем вводимой пробы, при котором минимизировалось размывание хроматографической зоны аналита при

оптимальной чувствительности, составлял 20 мкл. Постоянная времени детектора – 0,36 с. Учитывая физико-химические свойства иматиниба, содержащего в своей структуре атомы азота с неподеленной электронной парой, применяли динамическое модифицирование подвижной фазы. В качестве модификаторов использовали калий фосфорнокислый однозамещенный, ортофосфорную кислоту и триэтиламин. Калий фосфорнокислый однозамещенный использовали для увеличения ионной силы раствора, препятствующего протонизации основания и увеличению его гидрофобности и, следовательно, времени удерживания. Смещение равновесия «молекулярная форма – ионная форма» адсорбата осуществляли путем подкисления элюентов ортофосфорной кислотой. Триэтиламин применяли для дезактивации остаточных силанольных групп сорбента.

Изменяли состав подвижной фазы для получения на хроматограмме пика иматиниба с оптимальными значениями времени удерживания, разрешения, ширины, фактора асимметрии и эффективности разделения.

Зависимость хроматографических параметров пика иматиниба от состава подвижной фазы представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Зависимость хроматографических параметров пика иматиниба от состава подвижной фазы

Состав подвижной фазы	Средние значения хроматографических параметров пика иматиниба (n=5)			
	Время удерживания, мин	Ширина, мкл	Фактор асимметрии	Эффективность разделения, ТТ
А – 0,5 % KH_2PO_4 ; Б – ацетонитрил	14,09	20,6	3,22	13253
А – 0,5 % KH_2PO_4 , pH=3,3 (H_3PO_4); Б – ацетонитрил	12,51	19,4	1,72	26757
А – 0,5 % KH_2PO_4 – ацетонитрил – ТЭА 74:25:1, pH=3,3 (H_3PO_4); Б – ацетонитрил	10,26	18,2	1,54	30101
А – 0,5 % KH_2PO_4 – метанол – ТЭА 74:25:1, pH=3,3 (H_3PO_4); Б – метанол, pH=3,3 (H_3PO_4)	10,03	11,3	1,27	43158
А – 0,5 % KH_2PO_4 – метанол 75:25, pH=3,3 (H_3PO_4); Б – метанол, pH=3,3 (H_3PO_4)	9,81	16,2	1,61	28496

Показано, что применение калия фосфорнокислого однозамещенного, ортофосфорной кислоты и триэтиламина в качестве модификаторов элюента А и ортофосфорной кислоты в качестве модификатора элюента Б способствует уменьшению размывания хроматографической зоны иматиниба

и получению на хроматограммах его узкого и симметричного пика. Минимальные значения ширины и фактора асимметрии пика иматиниба и наибольшее значение эффективности разделения наблюдается при анализе раствора иматиниба с помощью следующего состава подвижной фазы: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – метанол – триэтиламин 74:25:1, pH=3,3; Б – метанол, pH=3,3. Пример хроматограммы раствора субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл при данном составе подвижной фазы представлен на рисунке 2.

Разработаны условия хроматографического анализа раствора субстанции иматиниба, включающие состав подвижной фазы, условия градиентного режима элюирования, температуру разделения, скорость потока, постоянную времени детектора, объем вводимой пробы и длину волны УФ-детектирования, позволяющие разделять иматиниб и компоненты плазмы крови человека с получением на хроматограммах узкого и симметричного пика иматиниба.

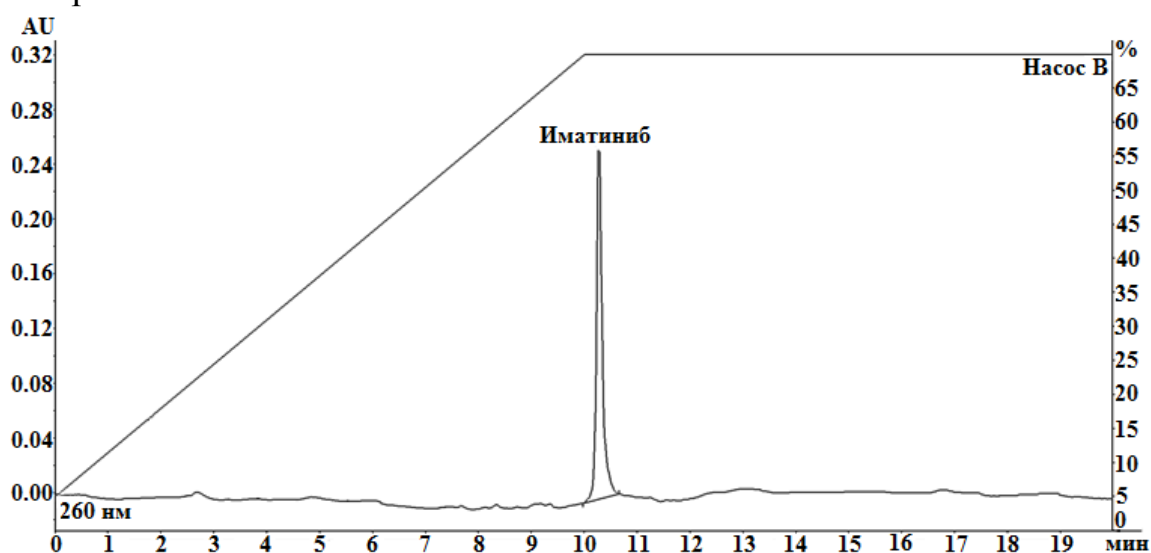


Рисунок 2 – Хроматограмма раствора иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл

Выбранные условия применяли для определения иматиниба в плазме крови человека.

В качестве метода пробоподготовки использовали жидкостно-жидкостную экстракцию ацетонитрилом по принципу QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно), основанном на извлечении аналита из матрицы ацетонитрилом, смешивающимся с водой в любых пропорциях, с последующим разделением водно-органического слоя за счет повышения ионной силы водной фазы с помощью неорганической соли. В качестве неорганической соли использовали натрия хлорид, являющийся дешевым и доступным высаливателем, который при разделении фаз дополнительно денатурирует и осаждает белки плазмы крови. В отличие от ранее применяемого при определении иматиниба методов осаждения белков и

экстракции, при экстракции ацетонитрилом по принципу QuEChERS происходит незначительный перенос эндогенных веществ плазмы крови в органический слой, что непременно повышает качество получаемых хроматограмм (наличие меньшего числа посторонних пиков) и, как следствие, селективность определения.

Для получения максимальной степени извлечения иматиниба из биологической матрицы поочередно изменяли такие условия пробоподготовки, как pH среды, объем экстрагента, скорость и время перемешивания при экстракции, время перемешивания при разделении фаз натрия хлоридом, определяя степень извлечения (%) по формуле:

$$R = \frac{S_2}{S_1} \cdot 100,$$

где: S_2 – площадь пика иматиниба в плазме крови;
 S_1 – площадь пика иматиниба в растворе субстанции аналогичной концентрации.

Графики зависимости степени извлечения иматиниба от изменяемых параметров пробоподготовки представлены на рисунках 3-7.

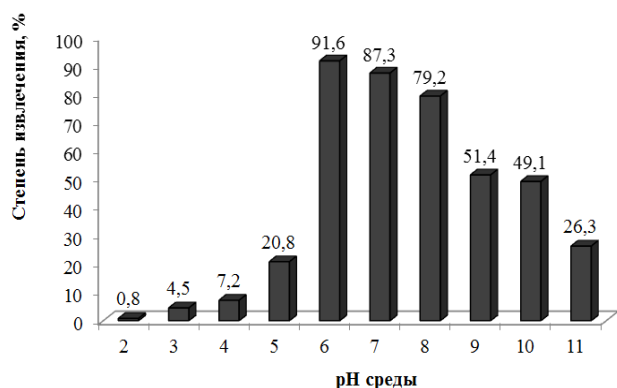


Рисунок 3 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от pH среды в процессе пробоподготовки

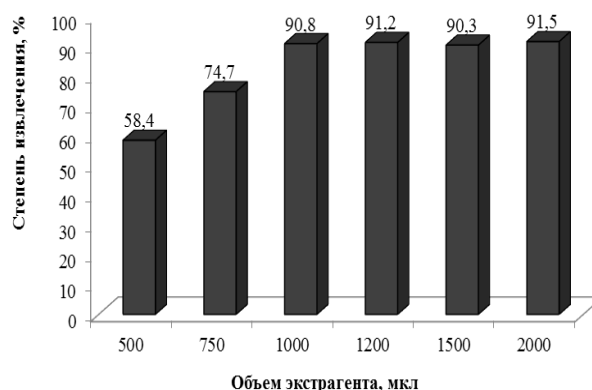


Рисунок 4 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от объема экстрагента в процессе экстракции

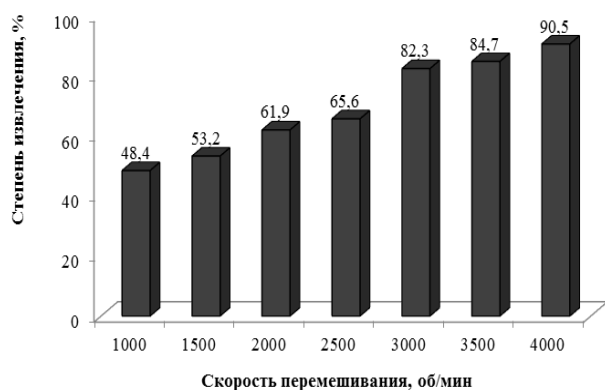


Рисунок 5 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от скорости перемешивания в процессе экстракции

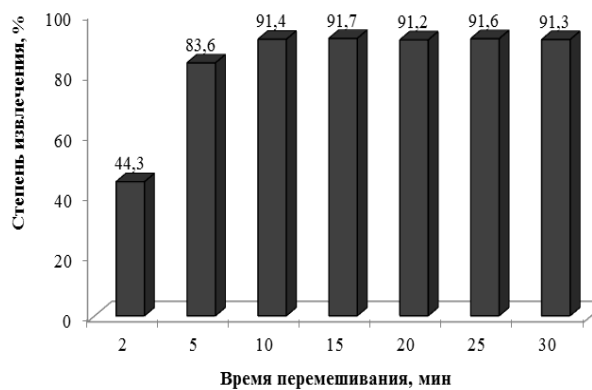


Рисунок 6 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от времени перемешивания в процессе экстракции

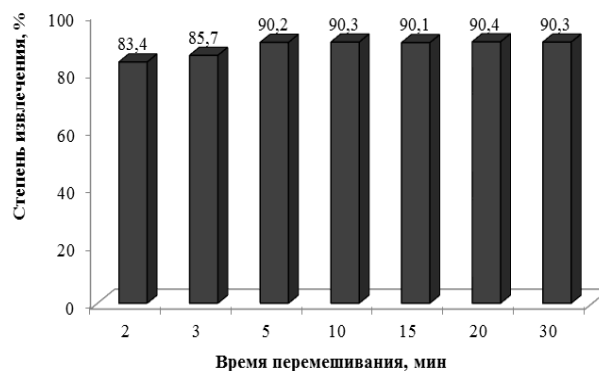


Рисунок 7 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от времени перемешивания в процессе разделения фаз

В ходе проведенных экспериментов выявлены условия процедуры пробоподготовки, обеспечивающие максимальную степень извлечения иматиниба из плазмы крови:

- рН среды – 6;
- объем экстрагента – 1000 мкл;
- скорость перемешивания – 4000 об/мин;
- время перемешивания при экстракции – 10 мин;
- время перемешивания при разделении фаз – 5 мин.

В результате проведенных исследований разработан алгоритм пробоподготовки образцов плазмы крови добровольцев для хроматографического определения иматиниба, представленный на рисунке 8.

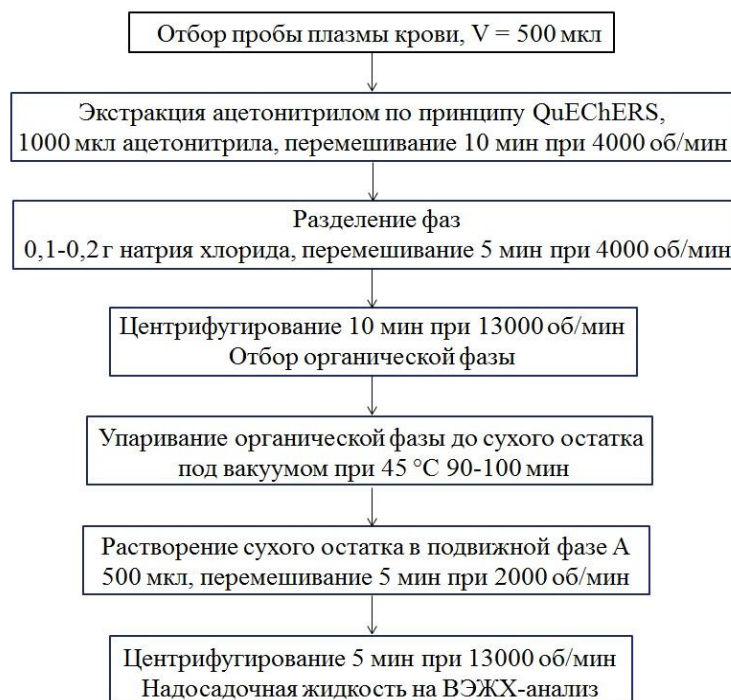


Рисунок 8 – Алгоритм пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба

Разработаны условия пробоподготовки образцов плазмы крови методом жидкостно-жидкостной экстракции ацетонитрилом по принципу QuEChERS для хроматографического определения иматиниба, позволившие увеличить его степень извлечения из плазмы крови человека до 92 %.

Разработана биоаналитическая методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Биоаналитическая методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

Приготовление 0,5 % раствора калия фосфорнокислого однозамещенного. Около 0,5 г калия фосфорнокислого однозамещенного растворяют в 100 мл воды очищенной и перемешивают.

Приготовление подвижной фазы А (ПФ А.) 74 мл 0,5 % раствора калия фосфорнокислого однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл метанола и перемешивают. Затем прибавляют 1 мл триэтиламина и тщательно перемешивают, рН полученного раствора доводят потенциометрически до значения 3,3 ортофосфорной кислотой.

Приготовление раствора иматиниба мезилата с концентрацией 0,1 мг/мл. Около 0,01 г (точная навеска) субстанции иматиниба мезилата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 5 мл подвижной фазы А, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают.

1 мл полученного раствора иматиниба мезилата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора подвижной фазой А до метки и перемешивают.

Приготовление исходных градуировочных растворов. Из раствора иматиниба мезилата с концентрацией 0,1 мг/мл методом параллельно-последовательного разведения готовят растворы иматиниба мезилата с концентрациями: 42, 33,6, 25,2, 16,8, 8,4, 4,2, 1,8, 0,9, 0,6 и 0,3 мкг/мл. Растворы используют свежеприготовленными.

Приготовление градуировочных растворов иматиниба в плазме крови человека. В пластиковую центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл помещают 450 мкл плазмы крови и прибавляют 50 мкл исходного градуировочного раствора иматиниба мезилата соответствующей концентрации, каждый раствор перемешивают на встряхивателе Vortex при 2000 об/мин в течение 5 мин. Затем прибавляют 1000 мкл ацетонитрила и тщательно перемешивают на встряхивателе Vortex при 4000 об/мин в течение 10 мин. К раствору прибавляют около 0,1-0,2 г натрия хлорида и перемешивают на встряхивателе Vortex при 4000 об/мин в течение 5 мин. Полученный раствор центрифугируют при 13000 об/мин в течение 10 мин. Водную фазу отбрасывают, а органическую упаривают досуха на вакуумном концентраторе при температуре 45 °С в течение 90-100 мин. К сухому остатку прибавляют 500 мкл ПФ А, перемешивают на встряхивателе Vortex при

2000 об/мин в течение 5 мин и центрифугируют при 13000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для хроматографического анализа.

Полученные градуировочные растворы анализируют методом ВЭЖХ.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Готовят модельный раствор иматиниба в плазме крови человека с концентрацией 4200 нг/мл.

Подготовка пробы. В пластиковую центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл помещают 500 мкл плазмы крови и прибавляют 1000 мкл ацетонитрила и тщательно перемешивают на встряхивателе Vortex при 4000 об/мин в течение 10 мин. К раствору прибавляют 0,1-0,2 г натрия хлорида и перемешивают на встряхивателе Vortex при 4000 об/мин в течение 5 мин. Полученный раствор центрифугируют при 13000 об/мин в течение 10 мин. Водную фазу отбрасывают, а органическую упаривают досуха на вакуумном концентраторе при температуре 45 °С в течение 90-100 мин. К сухому остатку прибавляют 500 мкл ПФ А, перемешивают на встряхивателе Vortex при 2000 об/мин в течение 5 мин и центрифугируют при 13000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для хроматографического анализа.

Хроматографические условия

Хроматограф – Милихром А-02 (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия);

Колонка – 75 × 2 мм с октадецил-модифицированным силикагелем (C₁₈), 5 мкм (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия);

Подвижная фаза (ПФ) – А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – метанол – триэтиламин (74:25:1), ортофосфорная кислота до рН 3,3;

– Б – метанол, рН=3,3;

Режим элюирования – градиентный:

Степень градиента	Время, мин	Доля элюента А, %	Доля элюента Б, %
Кондиционирование	15	95	5
0	0	95	5
1	10	30	70
2	20	30	70

Скорость потока – 0,1 мл/мин;

Температура колонки – 35 °С;

Детектор – спектрофотометрический, 260 нм;

Объем пробы – 20 мкл.

Проводят анализ раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания иматиниба должно быть равным $10,03 \pm 0,1$ мин, разрешение между пиком иматиниба и ближайшим посторонним пиком должно быть не менее 2,0, асимметрия пика иматиниба должна быть не более 1,5, эффективность разделения, рассчитанная по пику иматиниба, должна составлять не менее 20000 теоретических тарелок (ТТ).

Далее хроматографируют градуировочные растворы. По результатам анализа градуировочных растворов строят градуировочные графики зависимости площади пика анализируемого вещества от его концентрации в плазме крови. Концентрацию иматиниба в исследуемых образцах плазмы крови добровольцев определяют по градуировочному графику.

В четвертой главе представлены результаты валидации разработанной биоаналитической методики и расчета метрологических характеристик.

Специфичность анализа доказывали путем анализа 6 холостых образцов плазмы крови человека, не содержащих иматиниб и 6 модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл. Пример хроматограммы холостого образца плазмы крови человека представлен на рисунке 9, пример хроматограммы модельного образца плазмы крови человека, содержащего иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл, представлен на рисунке 10.

На хроматограммах холостых образцов плазмы крови показано отсутствие пиков веществ, совпадающих по времени удерживания с пиком иматиниба.

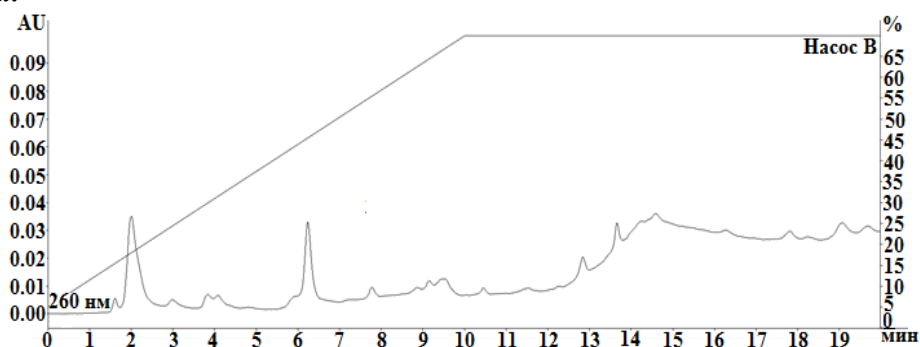


Рисунок 9 – Хроматограмма холостого образца плазмы крови человека

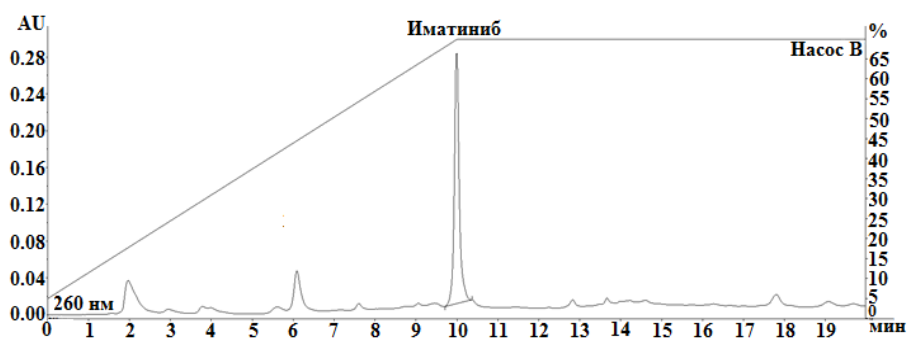


Рисунок 10 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови человека с концентрацией 4200 нг/мл

Предел обнаружения иматиниба в плазме крови человека устанавливали по соотношению сигнал/шум, которое должно составлять не менее 3/1. Анализировали холостой образец плазмы крови человека и определяли уровень шума, затем анализировали модельные образцы плазмы крови человека с низким содержанием иматиниба и устанавливали уровень (интенсивность) сигнала аналита.

Показатель высоты пика иматиниба по отношению к высоте шума для концентрации 10 нг/мл составляет 3,6/1, что удовлетворяет критерию, следовательно, такая концентрация является пределом обнаружения иматиниба в плазме крови человека согласно разработанной методике.

Нижний предел количественного определения (НПКО) иматиниба в плазме крови человека устанавливали аналогичным образом по соотношению сигнал/шум, которое должно составлять не менее 10/1.

Показатель высоты пика иматиниба по отношению к высоте шума для концентрации 30 нг/мл составляет 10,7/1, что удовлетворяет критерию, следовательно, нижним пределом количественного определения иматиниба в плазме крови человека, согласно разработанной методике, является концентрация, равная 30 нг/мл.

Линейность методики изучали на 11 уровнях концентрации: 30, 60, 90, 180, 420, 840, 1680, 2100, 2520, 3360 и 4200 нг/мл. Анализировали модельные образцы плазмы крови человека 3 серий, с содержанием иматиниба на уровне представленных концентраций и определяли площадь пика аналита. Усредненный градуировочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в модельном образце плазмы крови человека приведен на рисунке 11.

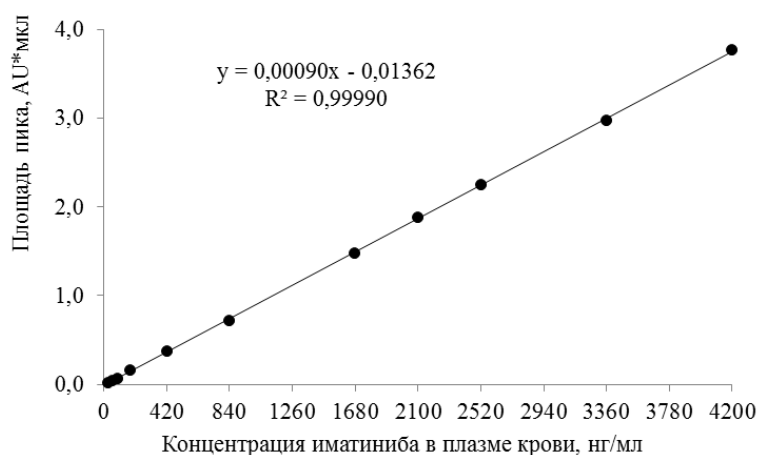


Рисунок 11 – Усредненный градуировочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в плазме крови человека

Квадрат коэффициента корреляции значительно превышает предельное значение 0,99. Следовательно, разработанная биоаналитическая методика обладает требуемой линейностью в диапазоне концентраций 30-4200 нг/мл.

Для оценки *правильности и повторяемости* разработанной методики

проводили анализ 6 серий модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб на 3 уровнях концентрации: 30, 2100 и 4200 нг/мл. Анализ выполняли в одной лаборатории, на одном оборудовании, одним аналитиком, в течение одного дня. Количественное содержание иматиниба в образцах плазмы крови человека определяли по градуировочному графику (метод «введено-найдено»). Для оценки *внутрилабораторной прецизионности* проводили анализ аналогичных образцов в другой день, другим аналитиком. Метрологические характеристики вычисляли для объединенного массива данных.

Расчет всех метрологических характеристик в процессе валидации производили согласно РМГ 61-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки».

Результаты расчета метрологических характеристик при оценке правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты расчета метрологических характеристик при оценке правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности

Уровень концентрации иматиниба в плазме крови, нг/мл	σ_r^* , нг/мл	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, нг/мл	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm \Delta^*с$, нг/мл	$\pm \Delta^*с$, %	$\pm \Delta^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, %
30	1,96	6,86	2,78	9,75	1,64	5,48	5,69	18,98
2100	49,48	2,34	96,31	4,56	56,92	2,71	197,17	9,39
4200	84,23	2,01	132,67	3,17	78,41	1,87	271,60	6,47

Для выявления времени, в течение которого исследуемые образцы стабильны, проводили различные исследования *стабильности* образцов плазмы крови человека с содержанием определяемого вещества на двух уровнях концентрации: 30 и 4200 нг/мл.

Установлено, что образцы аналита после процедуры пробоподготовки в растворенном виде не следует хранить при комнатной температуре (22-24 °С) более 8 ч, в холодильнике (3-6 °С) более 16 ч, аналогичные образцы в виде сухого остатка показали стабильность в течение всего срока хранения при заданных условиях. Процедура многократного (3 цикла) размораживания и замораживания образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб, не влияет на стабильность определяемого вещества. Хранение образцов плазмы крови в размороженном виде при комнатной температуре (22-24 °С) более 8 ч приводит к деградации аналита.

Для подтверждения отсутствия *переноса* сигнала аналита проводили анализ холостого образца плазмы крови человека после анализа образца с высокой концентрацией иматиниба (4200 нг/мл). Показано отсутствие пика иматиниба на хроматограмме холостого образца плазмы крови после анализа образца с высокой концентрацией аналита.

В процессе исследования *надежности* методики устанавливали влияние на параметры хроматографического пика иматиниба следующих изменяемых факторов:

- скорость потока элюентов;
- другая хроматографическая колонка;
- pH элюентов;
- реактивы для приготовления подвижной фазы других производителей;
- температура колонки;
- состав подвижной фазы.

Установлено, что применение реактивов других производителей и другой хроматографической колонки не приводит к критическим изменениям хроматографических параметров пика иматиниба. Факторами, критически изменяющими хроматографические параметры пика иматиниба, являются pH элюентов и их состав, скорость потока, температура колонки. Соблюдение данных условий анализа требует особого контроля.

В пятой главе приведены результаты применения разработанной и валидированной биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием. С помощью нее проведен анализ образцов плазмы крови добровольцев, после однократного приема тестируемого (IMB, капсулы 100 мг, Россия) и референтного (Гливек®, капсулы 100 мг, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) препаратов в рамках клинического исследования их биоэквивалентности.

По результатам анализа образцов плазмы крови добровольцев построены фармакокинетические профили зависимости концентрации иматиниба в плазме крови от времени забора крови. Фармакокинетические профили в виде графиков для средних значений приведены на рисунке 7.

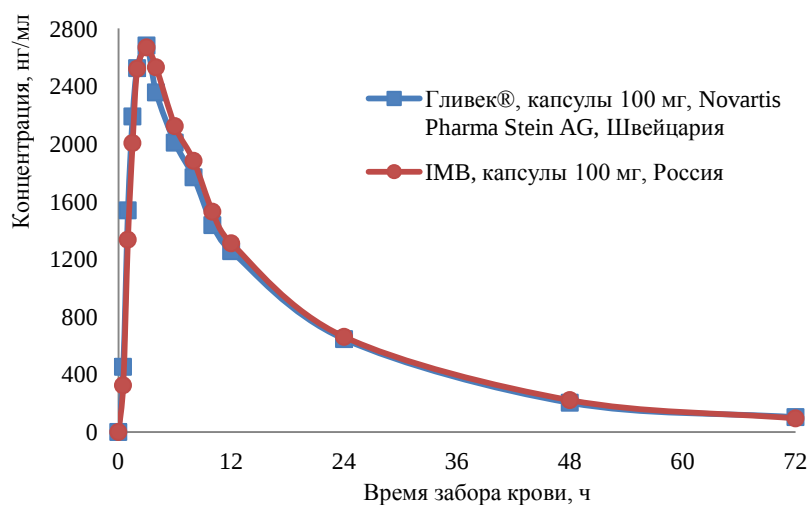


Рисунок 7 – Усредненные зависимости концентрации иматиниба (нг/мл) в плазме крови добровольцев от времени забора крови после однократного приема тестируемого и референтного препаратов в линейных координатах

По данным содержания иматиниба в плазме крови добровольцев рассчитаны фармакокинетические параметры и проведен их статистический анализ. На основании полученных результатов сделан вывод о биоэквивалентности исследуемого препарата ИМВ, капсулы 100 мг (Россия) препарату сравнения Гливек[®], капсулы 100 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария).

ВЫВОДЫ

1. Оценено влияние модификаторов подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба. Показано, что использование калия фосфорнокислого однозамещенного, ортофосфорной кислоты и триэтиламина в качестве модификаторов подвижной фазы А и Б приводит к уменьшению размывания хроматографической зоны иматиниба.

2. Разработаны хроматографические условия для количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Выбраны оптимальные параметры состава подвижной фазы, скорости потока, температуры, объема вводимой пробы и условий градиентного элюирования, позволяющие разделять иматиниб и компоненты биологической матрицы. Показано, что разработанный состав динамически модифицированной подвижной фазы А и Б способствует получению на хроматограммах узкого и симметричного пика иматиниба, что привело к увеличению чувствительности методики и снижению предела количественного определения иматиниба в плазме крови человека с 50 до 30 нг/мл.

3. Разработана новая методика пробоподготовки образцов плазмы крови для хроматографического определения иматиниба методом жидкостно-жидкостной экстракции по принципу QuEChERS. Данная процедура пробоподготовки позволила увеличить степень извлечения иматиниба из плазмы крови человека с 84 до 92 %.

4. Разработанная методика валидирована и доказана ее пригодность к количественному определению иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Установлено, что методика является линейной в диапазоне концентраций 30-4200 нг/мл, доказана специфичность определения иматиниба в многокомпонентной биологической матрице. Погрешность при определении иматиниба в плазме крови человека составляет от 6,47 до 18,98 %, СКО повторяемости составляет от 2,01 до 6,86 %, а СКО внутрилабораторной прецизионности – от 3,17 до 9,75 %. Определена стабильность анализируемых образцов при различных условиях хранения. Доказано отсутствие переноса сигнала аналита в холостой образец плазмы крови после анализа образца с высокой концентрацией иматиниба. Выявлены характеристики методики, критически влияющие на параметры пригодности хроматографической системы.

5. С помощью разработанной и валидированной методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом

ВЭЖХ с УФ-детектированием проведен анализ образцов плазмы крови добровольцев в клиническом исследовании биоэквивалентности препаратов иматиниба. Рассчитаны фармакокинетические параметры и проведен их статистический анализ.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Леонов, К. А. Исследование биоэквивалентности лекарственных препаратов на основе иматиниба / К. А. Леонов, А. А. Бакибаев // Успехи современного естествознания. – 2016. – №. 8. – С. 36-40.
2. Леонов, К. А. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ / К. А. Леонов, А. А. Бакибаев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 122-130.
3. Леонов, К. А. Определение иматиниба в плазме крови / К.А. Леонов // Интеграция науки, образования и производства – основа реализации Плана нации (Сагиновские чтения № 7): труды международной научно-практической конференции. – Караганда: КарГТУ, 2015. – Т. 3. – С. 305-307.
4. Леонов, К. А. Хроматографическое определение иматиниба в плазме крови человека / К. А. Леонов // Ломоносов-2016: материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Москва: МАКС Пресс, 2016. – С. 60.
5. Леонов, К. А. Определение иматиниба в плазме крови методом ВЭЖХ / К. А. Леонов // 54-я Международная научная студенческая конференция (МНСК-2016): Химия: материалы конференции. – Новосибирск: Изд-во НГУ, 2016. – С. 159.
6. Леонов, К. А. Клиническое исследование биоэквивалентности препаратов иматиниба / К. А. Леонов // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулева, посвященной 120-летию Томского политехнического университета. – Томск: ТПУ, 2016. – С. 296-297.
7. Леонов, К. А. Определение иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ в клиническом исследовании биоэквивалентности / К. А. Леонов // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2016. – С. 141.
8. Леонов, К. А. Количественное определение иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ / К. А. Леонов // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тезисы докладов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2016. – Т. 4. – С. 290.

Диссертант и его научный руководитель выражают благодарность генеральному директору ООО «Ифар» (г. Томск) д.м.н., профессору Хазанову В.А. за предоставленное оборудование и материалы для выполнения исследования, а также за ценные советы при постановке данного исследования и обсуждении его результатов.