

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Леонов Клим Андреевич

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

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Бакибаев А.А.

Томск 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.1 История открытия иматиниба.....	10
1.2 Физические и физико-химические свойства иматиниба	12
1.3 Инструментальные методы определения иматиниба в плазме крови человека.....	16
1.3.1 Определение иматиниба методом ВЭЖХ/МС.....	17
1.3.2 Определение иматиниба методом ВЭЖХ-УФ.....	19
1.4 Методы пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба	22
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	28
2.1 Объект исследования	28
2.2 Материалы и реактивы	28
2.3 Оборудование	28
2.3.1 Средства измерений.....	28
2.3.2 Вспомогательное оборудование.....	31
2.4 Условия оценки влияния состава подвижной фазы на хроматографические характеристики пика иматиниба и разработки параметров его хроматографического определения.....	32
2.5 Условия валидации биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека.....	34
2.6 Условия анализа образцов плазмы крови добровольцев, содержащих иматиниб, в клиническом исследовании биоэквивалентности.....	34
2.6.1 Условия исследования биоэквивалентности.....	34
2.6.2 Условия хроматографического определения иматиниба в образцах плазмы крови добровольцев	35
2.6.3 Расчет фармакокинетических параметров	36

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ	37
3.1 Разработка условий хроматографического определения иматиниба	37
3.1.1 Изучение спектральных характеристик иматиниба	37
3.1.2 Обоснование выбора хроматографических параметров определения иматиниба	38
3.1.3 Влияние состава подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба	39
3.2 Разработка методики пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба	47
3.3 Биоаналитическая методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием	58
ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И РАСЧЕТ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ	62
4.1 Проверка пригодности хроматографической системы	62
4.2 Оценка специфичности методики	65
4.3 Определение предела обнаружения методики.....	66
4.4 Установление нижнего предела количественного определения методики ...	70
4.5 Изучение линейности методики	71
4.6 Оценка правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики.....	74
4.7 Исследование стабильности анализируемых образцов	84
4.8 Оценка переноса сигнала определяемого вещества.....	86
4.9 Изучение надежности (устойчивости, робастности) методики	88
ГЛАВА 5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ	93
ВЫВОДЫ	99

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
Приложение 1.	115
Приложение 2.	116

ВВЕДЕНИЕ

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 [1-5]. 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) [6-7]. 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 [8]. 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 IMB, 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 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).

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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 История открытия иматиниба

Иматиниб был открыт в результате многолетних исследований, опиравшихся на небольшие, но значимые открытия в области фундаментальных исследований. В 1993 году американские ученые (ныне сотрудники компании Novartis), под руководством Н. Линдон и А. Маттер, приступили к осуществлению проектов по выявлению соединений с ингибиторной активностью в отношении протеинкиназ для лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) [9-23]. В одном из фармацевтических проектов фокусирование на протеинкиназы в качестве мишени проявило производное 2-фениламинопиримидина, которое было идентифицировано в качестве ведущего компонента (рисунок 1, черным цветом). Однако это соединение обладало низкой активностью и низкой специфичностью, ингибируя как серин/треонин, так и тирозинкиназы, но с этой отправной точки были синтезированы ряд производных. Добавление 3-пиридилльной группы в 3-положении пиримидинового фрагмента (рисунок 1, фрагмент А) усилило клеточную активность производных. Активность против тирозинкиназы была повышена путем введения бензамидной группы в фенильное кольцо (рисунок 1, фрагмент В). Ключевое наблюдение из анализа отношений структуры к активности соединения заключается в том, что замена в 6-м положении анилинового кольца фенильным радикалом привело к потере ингибирования протеинтирозинкиназы. Тем не менее, введение метильной группы в орто-положении диаминофенильного радикала существенно повышает активность в отношении тирозинкиназы (рисунок 1, фрагмент С). Скрининг соединения показал, что оно также ингибирует тирозинкиназы Abl. Первая серия соединений имела плохую биодоступность при пероральном приеме, с низкой растворимостью в воде. Прикрепление высокополярной боковой цепи N-метилпиперазина (рисунок 1, фрагмент D) заметно улучшило растворимость и биодоступность при пероральном приеме [24-32].

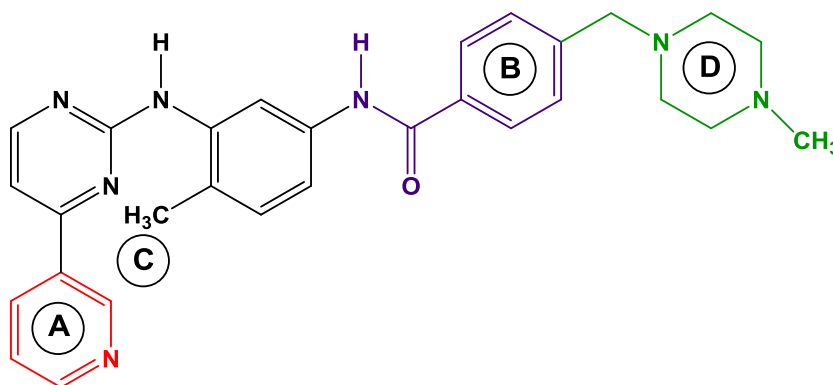


Рисунок 1 – Структура иматиниба и ее эволюция

Так называемое соединение STI571 (ранее CGP57148B, а теперь иматиниб) стало наиболее перспективным соединением для клинического развития, так как оно имело самую высокую селективность в отношении ингибирования роста экспрессирующих клеток рака крови [33-35].

Эффективность иматиниба в клинических испытаниях была ошеломляющей. В первом человеческом исследовании, которое началось в 1998 году, этот препарат восстановил нормальные показатели крови у всех 31 пациентов, принимавших, по крайней мере, 300 мг в день. В более поздних исследованиях, показатели крови возвращались к норме у около 95 % пациентов, которые находились в начальной фазе ХМЛ. В 2011 г исследование показало, что пациенты, у которых болезнь находится в стадии ремиссии после 2 лет лечения иматинибом, имеют такую же продолжительность жизни, как те, кто никогда не имел эту болезнь [36-45].

В то время как ранее одобренные препараты молекулярного таргетирования вмешивались в структуру белков, связанных с раком, иматиниб был первым, непосредственно отключающим сигнал белка, способного вызывать рак. Препарат был одобрен FDA (США) в мае 2001 г на II этапе клинических испытаний после рассмотрения FDA менее трех месяцев, что до сих пор является рекордом за все время [46-60].

1.2 Физические и физико-химические свойства иматиниба

Название по IUPAC – 4-[(4-метил-1-пиперазинил) метил]-N-[4-метил-3-[4-(3-пиридирил)-2-пиримидинил] amino] -фенил] бензамид. Эмпирическая формула иматиниба имеет вид: $C_{29}H_{31}N_7O$, иматиниба мезилата – $C_{29}H_{31}N_7O \cdot CH_4O_3S$, молекулярные массы – 493,6 и 589,7 соответственно [61].

В международном каталоге Sigma-Aldrich иматинибу присвоен CAS номер 152459-95-5, иматиниба мезилат можно найти под номером 220127-57-1 [62].

Иматиниб, согласно информации нескольких иностранных Фармакопейных статей, представляет собой белый или белый с слегка желтоватым оттенком цвета мелкокристаллический порошок, без запаха. Иматиниб не имеет в своей структуре хиральных центров и считается оптически не активным. Также является негигроскопичным [63-64].

Иматиниб в виде свободного основания практически нерастворим в воде (0,001 г/100 мл). Тем не менее, иматиниб в виде мезилата очень хорошо растворим в воде при значениях $pH < 5,5$, но плохо растворим или вовсе нерастворим в нейтральной и щелочной среде. Соединение растворимо или очень слабо растворимо в ДМСО, метаноле и этаноле, ацетонитриле, но нерастворимо в н-октаноле и ацетоне [61, 65].

Диапазон плавления иматиниба мезилата составляет от 225,4 до 226,0 °C [64].

Иматиниба мезилат содержит не более 1,0 % воды, определяемой в 1,0 г субстанции. Содержание сульфатной золы не более 0,2 %. 1,0 г субстанции соответствует предельному тесту на тяжелый металл, метод В (20 ppm) [61].

Вычисленное значение температуры кипения иматиниба мезилата под давлением 760 мм рт. ст. составляет 754,9 °C. Расчетное значение энтальпии пара – 115,42 кДж/моль. Рассчитанное значение температуры вспышки оказалось равным 410,3 °C, а давление пара, рассчитанное при 25 °C составляет $6,03 \cdot 10^{-24}$ мм рт. ст. [61].

Инфракрасный спектр поглощения иматиниба регистрировался как тонкая пленка (в таблетке с KBr) на спектрометре Perkin Elmer Spectrum One FTIR с использованием аксессуаров для отбора проб Universal ATR. Спектр показан на рисунке 2. Основные пики были отмечены на 1038, 1260, 1280, 1308, 1441, 1499, 1579, 1639 и 3275 cm^{-1} . Широкая полоса на 3275 cm^{-1} обусловлена поглощением валентных колебаний N-H для амидов с открытой цепью в твердом состоянии иматиниба [66].

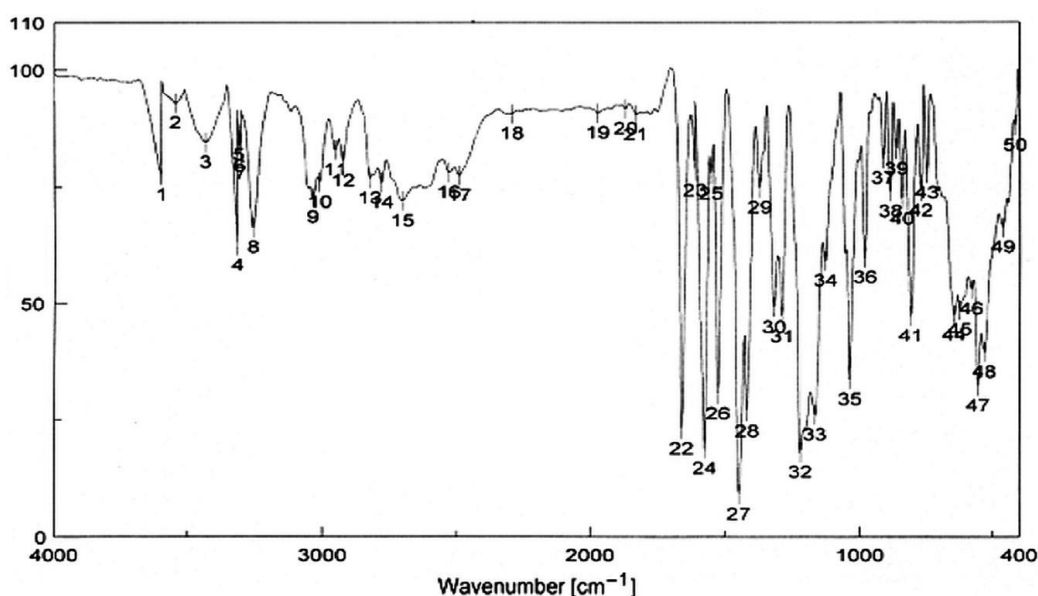


Рисунок 2 – ИК-спектр иматиниба

Спектры ^1H -ЯМР (ядерный магнитный резонанс) иматиниба были записаны на спектрометре Bruker Avance DRX-600 или DPX-400 (d_6 -DMSO, 600 МГц) в качестве внутреннего эталона DMSO $\text{dH} = 2,50$ ppm. Эксперименты COSY и HMQC использовались для облегчения распределения сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C . Химический сдвиг протона сильно зависит от температуры и, поскольку спектр снимали при 100 $^{\circ}\text{C}$, резонанс иматиниба может происходить почти везде в обычном диапазоне 1000 Гц ($\sim 11,4$ ppm) [67]. Спектр ^1H ЯМР иматиниба представлен на рисунке 3.

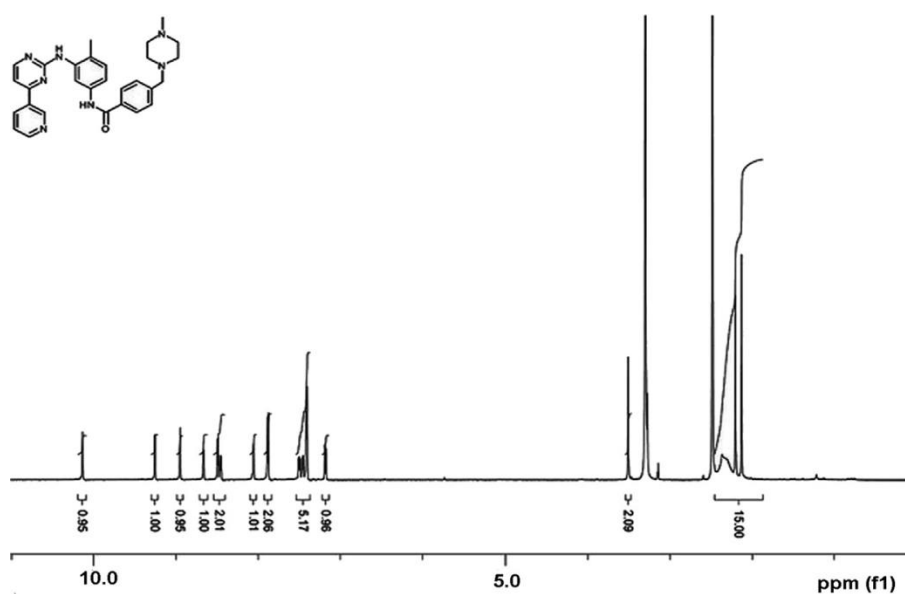


Рисунок 3 – Полный ^1H ЯМР-спектр иматиниба в $\text{d}_6\text{-DMSO}$

^{13}C ЯМР-спектры были получены с использованием тех же спектрометров с центральным пиком CDCl_3 в качестве внутреннего эталона (CDCl_3 dC = 77,2 ppm, 150 МГц). Эксперименты с DEPT 135 были использованы для помощи в назначении сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C [67]. Полученный спектр представлен на рисунке 4.

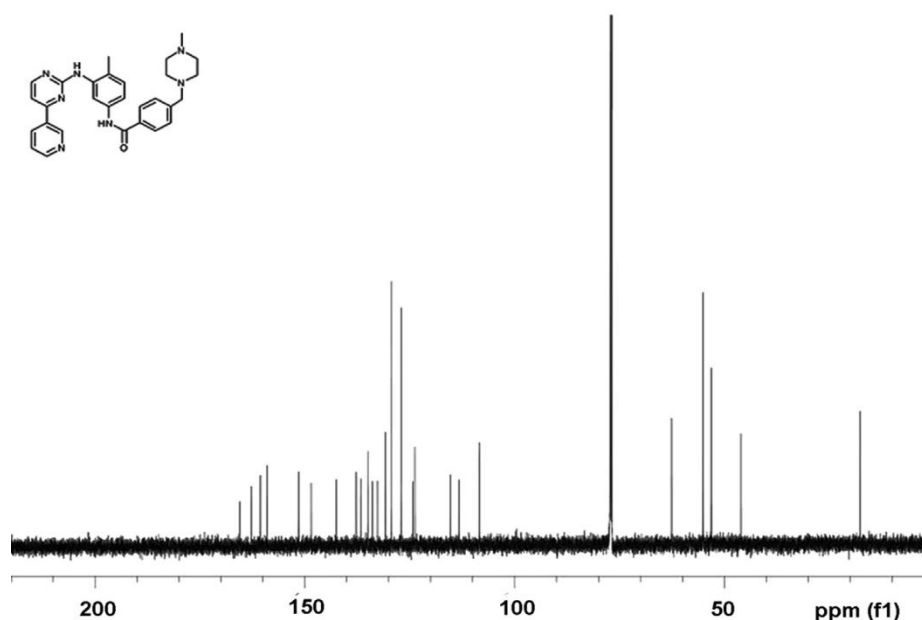


Рисунок 4 – Полный ^{13}C ЯМР-спектр иматиниба в CDCl_3

Масс-спектр иматиниба был получен с использованием масс-спектрометра HP1100 (Agilent Technologies, США) с источником электрораспылительной ионизации (ESI) TSQ-MS или LTQ-MS, соответственно, контролируемых программным обеспечением Xcalibur (Thermo Corporation, США), а также с использованием модели одноцентрального масс-спектрометра AEI MS12 с микромассивом VG 2S8, с температурой источника ионов 100-300 °C, энергией электронов 70 эВ и током ловушки 100 мА.

Ионные спектры продуктов иматиниба с TSQ-MS и LTQ-MS показаны на рисунках 5 и 6 соответственно.

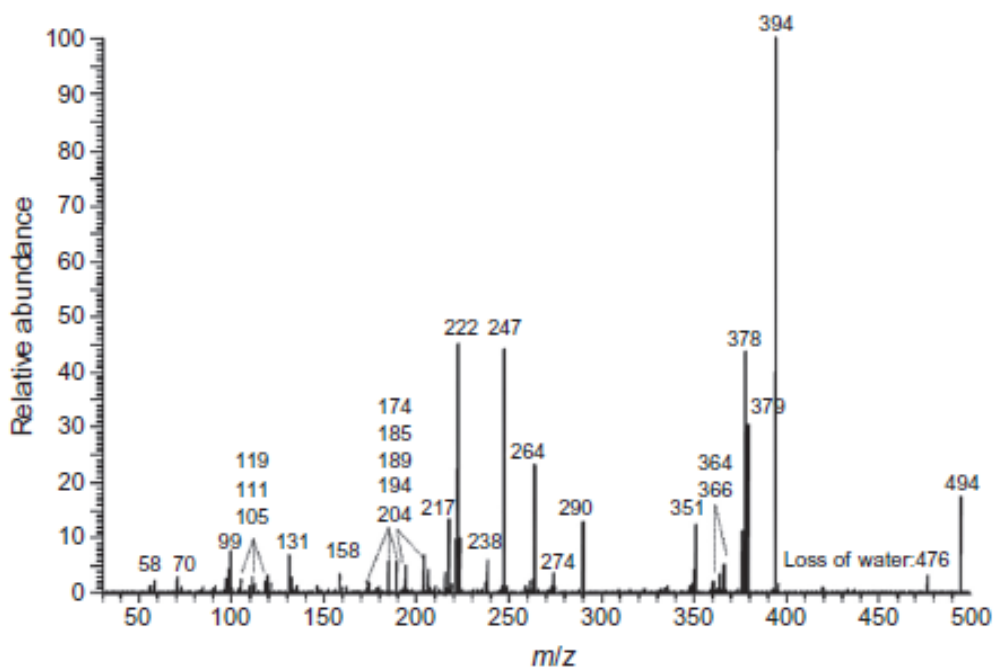


Рисунок 5 – Ионный спектр MS-продукта иона $[M+H]^+$ иматиниба (m/z 494) с ESI-TSQ-MS (трехкратная квадрупольная масс-спектрометрия)

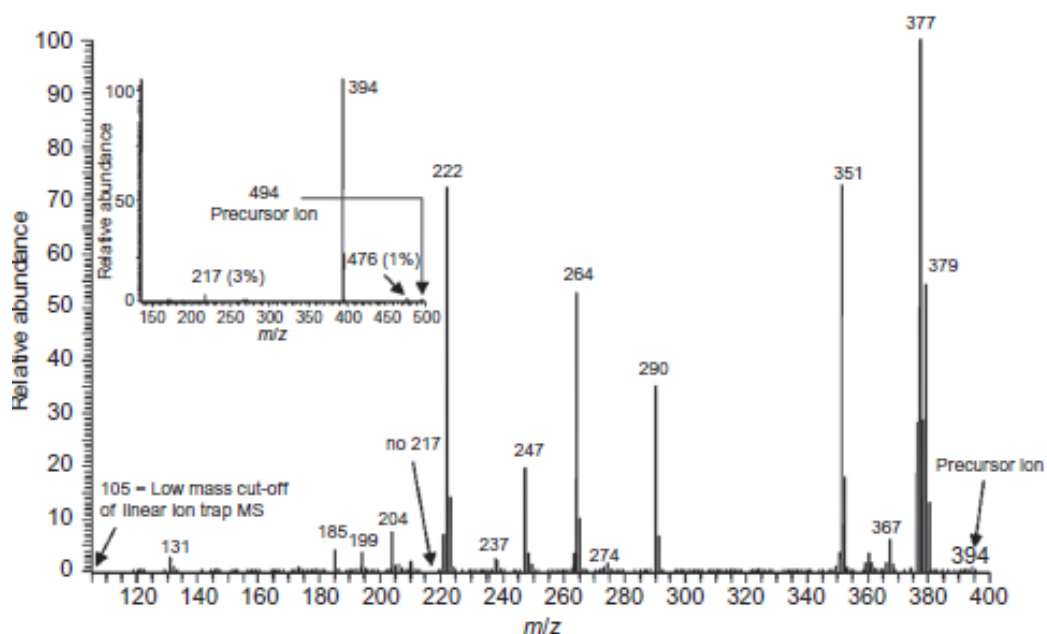


Рисунок 6 – Ионные спектры продуктов MS/MS и MS^3 ионов $[M+H]^+$ иматиниба: m/z 494 → ионы продукты и m/z 494 → 394 → ионы продукты соответственно на ESIC LTQ-MS (линейная ионная ловушка MS)

Ион продукта MS^2 с m/z 394 является базовым пиком и соответствует иматинибу с потерей метилпиперазина (100 а.е.м.). Ион продукта с метилпиперазиновым кольцом наблюдается при m/z 217 [67].

1.3 Инструментальные методы определения иматиниба в плазме крови человека

Существует перечень обязательных требований, предъявляемых к методу анализа при проведении клинических исследований: чувствительность, экспрессность, точность, селективность, возможность работы с малым объемом биоматериала, стоимость анализа [68-69]. Такими методами являются ВЭЖХ с УФ-детектированием и ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. В литературе они являются единственными методами определения иматиниба в биологических жидкостях, в том числе плазме крови.

ВЭЖХ – эффективный метод разделения сложных смесей веществ, широко применяемый в аналитической химии и основанный на участии компонентов разделяемой смеси в сложной системе ван-дер-ваальсовых взаимодействий

(преимущественно межмолекулярных) на границе раздела фаз. Ввиду сложности исследуемых объектов, ВЭЖХ включает предварительное разделение исходной сложной смеси на относительно простые. Полученные простые смеси анализируются (детектируются) затем обычными физико-химическими методами или специальными методами, созданными для хроматографии [70-79].

Среди хроматографических методов наибольшее распространение при определении лекарственных веществ получила ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием [69, 80-82].

Метод УФ-детектирования в ВЭЖХ хоть и является наиболее распространенным, однако, его основное ограничение – недостаточная чувствительность при определении минорных концентраций лекарственных средств в сложной многокомпонентной матрице [69, 83]. Такие задачи чаще решаются с использованием масс-спектрометрического детектора.

Масс-спектрометрия – это физико-химический метод анализа, основанный на ионизации компонентов пробы с последующим их разделением и регистрацией образующихся ионов. Масс-спектр позволяет получить информацию о молекулярной массе вещества, его составе и структуре. Для записи масс-спектра вводят образец в источник ионов, переводят его молекулы в заряженную форму, разделяют ионы по массам и регистрируют их массы и количество [84-87].

К достоинствам ВЭЖХ-МС можно отнести:

- возможность исследования более 95 % всех лекарственных средств, используемых в современной фармакотерапии;
- возможность быстрого перехода от одной методики к другой без сложных предварительных действий;
- малый объем биоматериала, требуемый для анализа [69].

1.3.1 Определение иматиниба методом ВЭЖХ/МС

В литературе существует немало методик определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ/МС [6-7, 88-100].

Масс-спектрометрические методики [88-92] составляют пока порядка 30 % от их общего числа, ввиду высокой стоимости оборудования и малой распространенности в аналитических лабораториях. Так как большинство современных жидкостных хроматографов способны одинаково обеспечивать необходимые параметры в процессе анализа и отличаются, по сути, только приборным исполнением, использование хроматографов разных моделей разных фирм не влияет на получаемый результат. Известно применение следующих жидкостных хроматографов в ВЭЖХ/МС определении иматиниба: Waters 1525 (США), Thermo Scientific P4000 (Франция), Waters 600E (США), Waters E2695 (США), Waters AcQuity UPLC (США), Shimadzu LC-20AD (Япония), Thermo Scientific Rheos 2200 (США). В отличие от жидкостных хроматографов, масс-селективные детекторы при определении иматиниба в плазме крови подбираются в зависимости от решаемых задач, но, как правило, используется имеющийся в лаборатории прибор. В литературе встречается применение следующих масс-спектрометров при определении иматиниба методом ВЭЖХ/МС: Waters Micromass ZQ (США), Waters Acquity TQD (США), Waters Quattro Micro API (США), Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra (США).

Как и в случае большинства сложных органических соединений, в том числе лекарственных веществ, предварительное хроматографическое разделение при определении иматиниба методом ВЭЖХ/МС проводится на обращенно-фазовых колонках. Тип, марка и размеры используемых колонок часто определяются наличием таковых в аналитической лаборатории или поставленными задачами перед аналитиком. Известны случаи разделения на колонках с сорбентом Waters Atlantis T3 C₁₈, XTerra RP18, Phenomenex Luna C₁₈, XTerra MS C₁₈, Waters XBridge RP18, Phenomenex Gemini C₁₈, Hypersil Gold C₁₈, длина которых варьируется от 50 до 150 мм, диаметр – от 2,0 до 4,6 мм, диаметр пор сорбента – от 1,9 до 5 мкм. В качестве модификаторов подвижной фазы А применяют вещества, усиливающие ионизацию иматиниба – 0,05-0,1 % уксусную кислоту, аммония ацетат различной концентрации (4-10 мМ), 1 мМ аммония гидроксид. Подвижной фазой Б служит ацетонитрил или метанол, что

объясняется растворимостью в них иматиниба. Во всех случаях авторы используют градиентный режим элюирования, скорость потока при этом равна 0,25-1 мл/мин, температура колонки поддерживается в диапазоне 30-40 °С, объем вводимой пробы – 10-50 мкл. Режим ионизации – электроспрей, напряжение на капилляре электроспрея составляет около 3,5-4 кВ, температура источника – 110-120 °С. Ионом-прекурсором служит ион с m/z $494 \pm 0,6$, отвечающий протонированной форме молекулы иматиниба.

Чувствительность методик определения иматиниба в плазме крови методом ВЭЖХ/МС варьируется в пределах 5-78 нг/мл [88-92]. Такая разница может быть обусловлена различными хроматографическими и масс-спектрометрическими условиями, а также отсутствием оптимизации задаваемых параметров оборудования с целью получения наиболее интенсивного сигнала аналита.

1.3.2 Определение иматиниба методом ВЭЖХ-УФ

Условия определения иматиниба в плазме крови методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием [6-7, 93-100], как и в случае ВЭЖХ/МС, многочисленны и еще более разнообразны. Известно применение жидкостных хроматографов: Waters Alliance E2695 XC (Сингапур), Waters 2487 (США), Jasco PU-2080 plus (Япония), Hitachi VWR (Япония), Agilent 1200 (Германия), Hewlett Packard 1050 (США), Dionex UltiMate 3000 (Англия), Perkin Elmer 200 (Германия), Shimadzu LC-10ATVP (Япония), Agilent 1100 (США). В большинстве случаев разделение проводят на обращенно-фазовых сорбентах: Waters Atlantis T3, Phenomenex Luna C₁₈, Develosil C₁₈, CAPCELL PAK C₁₈ MG II, LiChrospher 100 RP C₁₈, Waters Symmetry YMC packpro C₁₈, Bondapak C₁₈, Hypersil C₁₈, Hypersil BDS C₁₈, Xterra C₁₈, Zorbax Extend C₁₈. Однако существуют ВЭЖХ-УФ методики, реализуемые на других типах сорбентов, к примеру с привитыми цианогруппами – Agilent Zorbax SB Cyano, Inertsil CN-3 или фенильными группами – Phenomenex Gemini C₆-Phenyl, Hypersil C₁₈ Phenyl, а также просто с менее разветвленной алкильной цепью C₈ – LiChrospher 100-5 RP8. Длина применяемых колонок варьируется в пределах 150-250 мм, диаметр – 3,0-4,6 мм,

диаметр зерна – 3,5-5,0 мкм. В отличие от масс-спектрометрического анализа, где выбор модификаторов подвижной фазы очень ограничен, в ВЭЖХ с УФ-детектированием имеется огромный арсенал как органических, так и неорганических веществ, добавляемых в подвижную фазу и меняющих свойства, как сорбента, так и сорбата. Известны варианты использования таких модификаторов подвижной фазы, как дигидрофосфаты калия, натрия и аммония, гептилсульфонат натрия, ацетат аммония. Разделение проводится при различных значениях pH элюентов – от 2,5 до 10,5, создаваемых с помощью кислот – фосфорной, хлорной, уксусной, и оснований – триэтиламина и гидроксида аммония. Подвижной фазой Б, аналогично ВЭЖХ/МС методикам, служат ацетонитрил, метанол или их смесь. Скорость потока подвижной фазы составляет от 0,35 до 2,0 мл/мин, температура колонки – от комнатной температуры до 35 °С, объем вводимой пробы – 10-75 мкл, длины волн спектрофотометрического детектора – 237, 240, 254, 260, 263, 265, 266, 267, 268, 285 [6-7, 93-100].

Несмотря на наличие готовых методик количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, главной проблемой и недостатком остается их чувствительность. Предел количественного определения всех данных методик без учета концентрирования образца составляет не менее 50 нг/мл. Низкая чувствительность может складываться из нескольких факторов. Так как предел количественного определения методики стандартно определяется по соотношению уровня аналитического сигнала к уровню шума, одними из таких факторов могут служить параметры хроматографического пика. Неверный выбор хроматографических условий или недостаток их оптимизации приводит к получению неоптимальных или вовсе несоответствующих требованиям параметров хроматографического пика, таких как фактор асимметрии и ширина. Широкий и несимметричный пик является поводом для потери его интенсивности и, как следствие, чувствительности аналитической методики.

К примеру, на хроматограмме (рисунок 7) одной из немногих отечественных методик определения иматиниба в плазме крови человека [7]

виден широкий и асимметричный пик иматиниба, что говорит о неверно подобранных условиях хроматографического анализа или отсутствии их оптимизации.

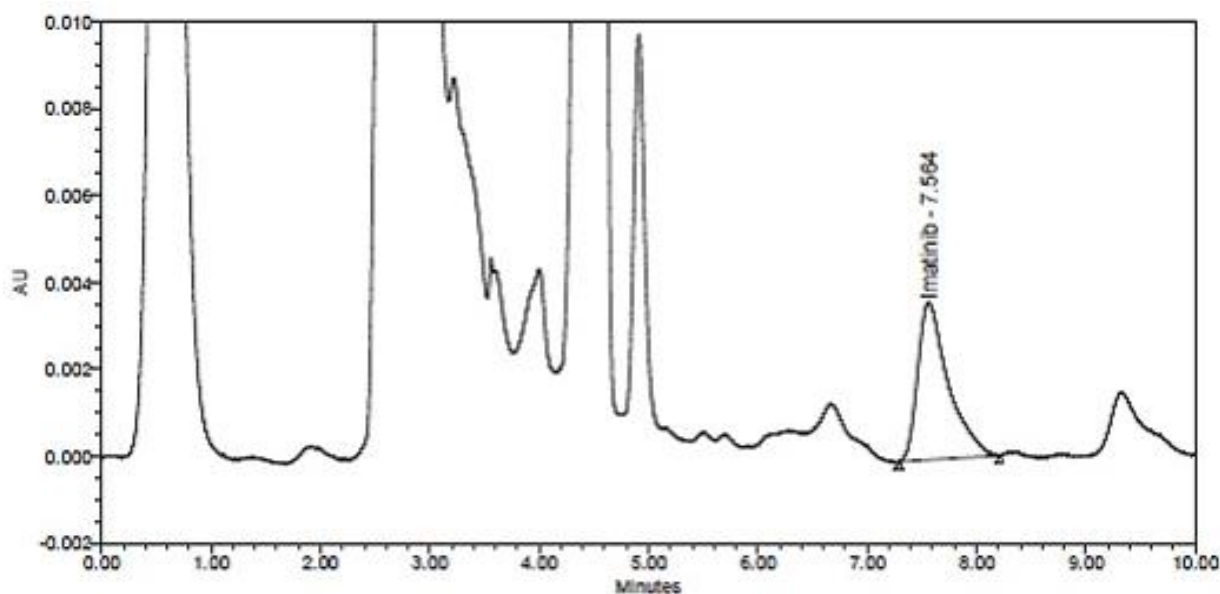


Рисунок 7 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови человека [7]

Согласно данной методике фактор асимметрии пика иматиниба составляет 1,68, наблюдается низкая эффективность разделения, рассчитанная по пику иматиниба и равная 6700 теоретических тарелок (ТТ). Предел количественного определения равен 50 нг/мл, хотя объем вводимой пробы составляет 75 мкл (при обычном объеме вводимой пробы, равном 5-20 мкл). Такая невысокая чувствительность может быть характеризована неоптимальными параметрами хроматографического пика иматиниба, приводящими к потере интенсивности аналитического сигнала.

В методике представленной компанией Agilent Technologies и разработанной также отечественными авторами [100] предел количественного определения составляет все те же 50 нг/мл. На хроматограммах (рисунок 8) наблюдается широкий и асимметричный пик иматиниба.

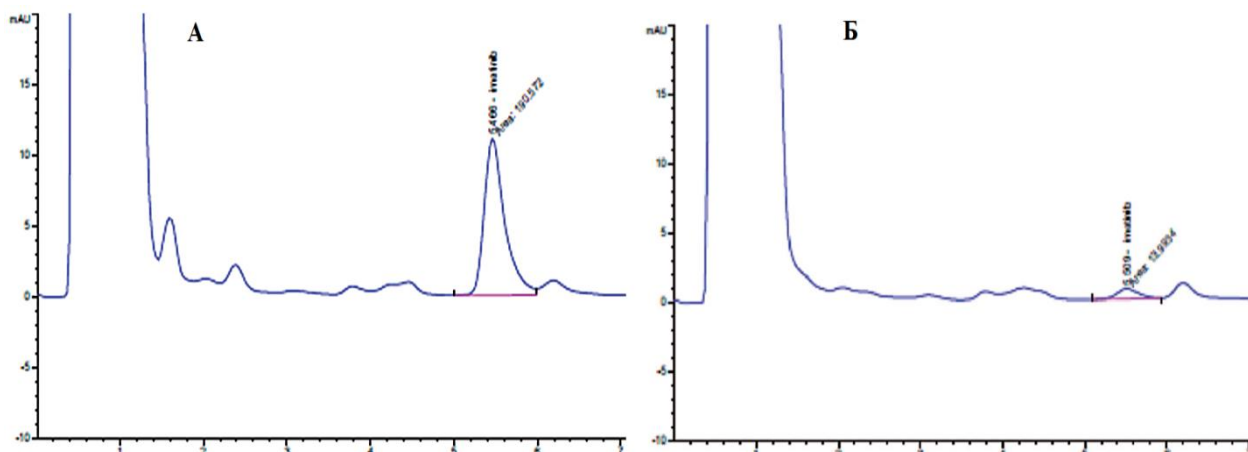


Рисунок 8 – Хроматограммы иматиниба в плазме крови с концентрациями 1000 (А) и 50 нг/мл (Б) [100]

Значение асимметрии составляет 1,85, эффективность разделения низкая – 8912 ТТ. Вероятно, что при разработке этой методики авторы подошли необоснованно к выбору хроматографических условий для получения пика с наиболее высокой его интенсивностью и наименьшими шириной и фактором асимметрии.

1.4 Методы пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба

При выполнении анализа стремятся к получению результата с минимальной погрешностью. Общая погрешность результатов аналитического исследования равна сумме погрешностей на каждом из его этапов. Следовательно, при правильном выборе метода анализа достоверность результатов химического анализа в значительной мере зависит от правильного отбора пробы и ее подготовки для анализа, поскольку погрешности, допущенные на этих этапах, приводят к искажению конечных результатов химического анализа даже при самом тщательном выполнении этого этапа исследования [101].

Помимо неверно подобранных условий хроматографического анализа, еще одним фактором, влияющим на чувствительность методики, является пробоподготовка, а точнее связанный с ней важнейший параметр – степень извлечения.

Степень извлечения – это отношение количества аналита, полученного при анализе пробы, к известному количеству аналита в этой пробе, выраженное в процентах. Неполноценная степень извлечения вещества из биологической матрицы ведет к потере аналита и, следовательно, к потере аналитического сигнала и чувствительности методики.

Степень извлечения вещества зависит от свойств выбранного растворителя и от состояния вещества в биологической матрице. Некоторые вещества можно практически полностью извлечь при однократной процедуре извлечения. Для других требуется двух-, трех- или многократное извлечение. Если об этом не говорится в прописи, следует предварительно установить степень извлечения опытным путем. Эффективность извлечения в сильной степени зависит от условий, в частности от pH, температуры, времени, поэтому необходимо точно придерживаться указаний, приведенных в методике. Разрабатывая методику, необходимо, правильно подобрав параметры пробоподготовки, дополнительно их оптимизировать и выявить существенные влияния на степень извлечения [102-103].

В литературе в качестве методов пробоподготовки образцов плазмы крови для определения в них иматиниба применяют осаждение белков, жидкостно-жидкостную экстракцию и твердофазную экстракцию.

Осаждение белков является наиболее простым и быстрым способом пробоподготовки, не требующим редких и дорогих реактивов и сложного оборудования [7, 88-91, 96-97]. Белки в растворе и соответственно в организме сохраняются в нативном состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная оболочка вокруг нее. Удаление этих факторов приводит к склеиванию молекул белков и выпадению их в осадок. Осаждение белков может быть обратимым и необратимым в зависимости от реактивов и условий реакции.

В качестве осадителей белков плазмы крови разработчики методик применяют органические растворители, как правило, метанол, ацетонитрил или их смесь в различных пропорциях. Количество добавляемого осадителя для

полноценной процедуры извлечения иматиниба превосходит объем плазмы крови в 2-5 раз. При этом, после тщательного перемешивания в течение определенного промежутка времени проба центрифугируется с целью выделения надосадочного водно-органического слоя. В некоторых случаях надосадочная жидкость упаривается до сухого остатка, который в свою очередь перерастворяется в подходящем для ВЭЖХ-анализа растворителе, а иногда вводится в хроматограф напрямую. Известны варианты осаждения белков различными кислотами, к примеру, хлорной (HClO_4) или трифторуксусной (CF_3COOH) [7, 96]. Эти кислоты являются более сильными осадителями белков, чем ацетонитрил и метанол, поэтому их количество, добавляемое к плазме крови, не превышает $\frac{1}{2}$ части объема биологической среды.

Известны варианты применения жидкостно-жидкостной экстракции для извлечения иматиниба из плазмы крови человека [6, 92]. Экстракция – это наиболее распространенный метод выделения, разделения и концентрирования веществ, в том числе лекарственных средств, основанный на распределении растворенного вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами с условием преобладания его в одной из фаз [102].

При извлечении иматиниба из плазмы крови экстрагентом служит метанол, ацетонитрил или их смесь. Такой узкий выбор растворителя, применяемого при жидкостной экстракции, ТФЭ или осаждении белков объясняется избирательной растворимостью в них исследуемого соединения. Экстракцию проводят либо при нейтральных, либо при кислых значениях pH среды. Количество добавляемого экстрагента составляет обычно 2-3-кратный избыток в отношении объема биологической матрицы.

Твердофазная экстракция – это метод выделения и очистки веществ, основанный на распределении целевого компонента между подвижной и неподвижной фазами в результате сорбционных и/или ионнообменных процессов, протекающих в специальной колонке (картридже). В случаях использования твердофазной экстракции для извлечения иматиниба из плазмы крови человека [93-95, 98] растворителями для активации картриджа и для элюирования аналита

служат метанол, ацетонитрил или их смесь. При этом применяют картриджи различных производителей и марок – Oasis HLB, Supelco Discovery DSC-CN, Varian Bond Elut, Extrelut HT3. Все они имеют высокую стоимость, однако ввиду высокой селективности применению ТФЭ нет равных.

Используя такой широкий арсенал способов пробоподготовки для извлечения иматиниба из плазмы крови, авторы методик часто не упоминают о важнейшем факторе – степени извлечения, который оказывает прямое влияние на чувствительность методики. Неполноценное извлечение вещества из биологической матрицы ведет к недостатку интенсивности аналитического сигнала и, следовательно, к заниженной чувствительности. Степень извлечения иматиниба из плазмы крови человека, согласно существующим методикам, составляет в среднем 84 % [88-100]. Невысокая чувствительность методик определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ может быть связана с неправильной процедурой пробоподготовки, в результате которой происходит неполноценное извлечение аналита. Для максимальной степени извлечения вещества из биологической среды необходимо осуществлять обоснованный выбор условий, влияющих на данный показатель, таких, как рН среды, температура, время и скорость процесса.

Еще один важнейший параметр, не влияющий на степень извлечения, но напрямую зависящий от условий пробоподготовки – это специфичность (селективность). Специфичность – это способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце и мешать определению целевого компонента. В случае хроматографических методов анализа специфичность подтверждается отсутствием пиков посторонних веществ на хроматограммах холостой матрицы совпадающих по времени удерживания и накладывающихся на пик основного вещества. Однако в случае некоторых методов пробоподготовки или их методических особенностей бывает тяжело достичь специфичности. При проведении процедуры осаждения белков в отделяемую затем надосадочную жидкость переходит большое число неосаждаемых эндогенных веществ плазмы

крови – жиров, липидов. Это отражается наличием множества посторонних пиков на хроматограммах и отсутствием требуемого разрешения между этими пиками и пиком аналита и, как следствие, низкой специфичностью. Так, в случае осаждения белков трифторуксусной кислотой в одной из уже упомянутых методик отечественных авторов [7], на полученной хроматограмме (рисунок 7) наблюдается множество посторонних пиков веществ плазмы крови. Еще более «грязная» хроматограмма (рисунок 9) наблюдается в методике определения иматиниба при условиях осаждения белков плазмы крови метанолом и хлорной кислотой [96].

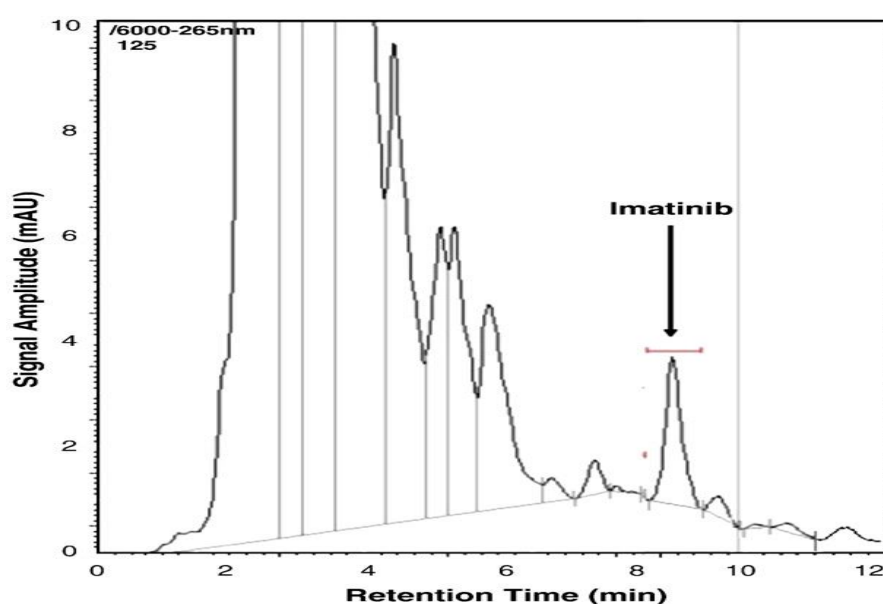


Рисунок 9 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови при осаждении белков метанолом и хлорной кислотой [96]

Помимо низкой специфичности, ввиду плохого разрешения между пиком аналита и пиками посторонних веществ, из-за наличия эндогенных веществ плазмы крови хроматографическая колонка может подвергаться быстрому износу вследствие загрязнения входного фильтра. Поэтому процедура пробоподготовки должна быть направлена на полноценное извлечение аналита и минимальное присутствие в анализируемой пробе посторонних веществ.

Таким образом, в результате литературного обзора показано, что иматиниб является современным высокоэффективным противораковым лекарственным средством, применяемым при лечении миелоидного лейкоза. Единственными

методами, применяемыми при определении иматиниба в плазме крови человека, являются ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и ВЭЖХ с УФ-детектированием. ВЭЖХ/МС обладает рядом преимуществ, в числе которых главным является его чувствительность. Нижний предел количественного определения иматиниба в плазме крови человека достигает в некоторых методиках 5-10 нг/мл. Однако, ввиду высокой стоимости оборудования, применение ВЭЖХ/МС метода пока остается весьма затруднительным. ВЭЖХ-УФ метод более простой и доступный, в связи с чем, является предпочтительным для различных фармакокинетических исследований. Однако ряд существующих методик не отвечает полноценно решаемым задачам. Чувствительность таких методик без учета концентрирования образца не превышает 50 нг/мл, наблюдается низкая селективность определения за счет множества посторонних пиков на получаемых хроматограммах. На сегодняшний день актуальной остается задача разработка более чувствительной биоаналитической методики определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с обоснованным выбором условий хроматографического анализа и пробоподготовки.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объект исследования

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. Субстанцию применяли для приготовления градуировочных и исходных градуировочных растворов, для приготовления раствора для проверки пригодности хроматографической системы. В работе использовали субстанцию иматиниба мезилата с количественным содержанием действующего вещества 100,4 %, определенным методом ВЭЖХ, серии 1606469, производства «Synthon Blansko» (Чехия). Сертификат качества на фармацевтическую субстанцию иматиниба мезилата представлен в Приложении 1.

2.2 Материалы и реактивы

Для приготовления подвижной фазы, а также в процессе пробоподготовки образцов плазмы крови использовали следующие реактивы:

- метанол марки «для ВЭЖХ» (J.T. Baker, США);
- вода очищенная согласно ГФ XIII ФС 2.2.0020.15 «Вода очищенная»;
- ацетонитрил марки «для ВЭЖХ», ТУ 2634-002-54260861-2013 (ООО «НПК Криохром», Россия);
- калий фосфорнокислый однозамещенный хч, ГОСТ 4198-75 (ООО «Омскреактив», Россия);
- ортофосфорная кислота хч, ГОСТ 6552-80 (ООО «Компонент-реактив», Россия);
- триэтиламин 99,9 % (Panreac, Испания);
- натрия хлорид хч, ГОСТ 4233-77 (ЗАО «Купавна-реактив», Россия).

2.3 Оборудование

2.3.1 Средства измерений

При разработке и валидации биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ, а также при

определении содержания иматиниба в плазме крови добровольцев, принявших участие в клиническом исследовании биоэквивалентности, использовали жидкостной хроматограф Милихром А-02 (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия). Хроматограф Милихром А-02 снабжен двухшприцевым градиентным насосом, способным создавать скорость потока 5-1000 мкл/мин, автоматическим автодозатором на 46 позиций, твердотельным электрическим термостатом колонки с максимальной температурой нагрева 90 °С и двухлучевым УФ-спектрофотометрическим детектором.

Хроматографическое разделение проводили на колонке ProntoSIL 120-5- C_{18} AQ, размером 75 × 2 мм, заполненной октадецил-модифицированным силикагелем (C_{18}) с размером зерна сорбента 5 мкм.

Хроматограф прошел процедуру квалификации технологического оборудования, а именно квалификацию проекта (Design qualification – DQ), квалификацию установки/монтажа (Installation qualification – IQ), квалификацию функционирования (Operational qualification – OQ) и квалификацию эксплуатации (Performance qualification – PQ).

Подготовку и проверку работы жидкостного хроматографа Милихром А-02, совмещенного с персональным компьютером производили в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

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).

Получение 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 применяли лабораторный pH-метр-милливольтметр pH-410 (ЗАО «Аквилон», Россия), предназначенный для

оперативного определения водородного показателя (pH) и окислительно-восстановительного потенциала (Eh). Значение pH контролировали лабораторным комбинированным стеклянным электродом общего назначения ЭСЛК-01.7 (ЗАО «Аквилон», Россия).

Взвешивание точных навесок фармацевтической субстанции иматиниба мезилата, а также навесок реактивов для приготовления подвижной фазы проводили на лабораторных электронных аналитических весах ЛВ 210-А (ЗАО «Сартогосм», Россия) с погрешностью взвешивания не более 0,0005 г.

Для приготовления растворов субстанции иматиниба мезилата и приготовления подвижной фазы использовали мерную лабораторную стеклянную посуду (ГОСТ 1770-74): мерные колбы вместимостью 10, 20, 50 и 100 см³, мерные цилиндры вместимостью 10, 25 и 100 см³. Соответствующие разбавления проводили при помощи стеклянных градуированных пипеток (ГОСТ 29228-91) вместимостью 1 и 5 см³.

В процессе дозирования при пробоподготовке образцов плазмы крови использовали одноканальные автоматические пипеточные дозаторы переменного объема «Лайт» (Thermo Scientific, Германия) вместимостью 20-200 и 100-1000 мкл.

Температуру и влажность окружающей среды в измерительной и химической лабораториях на протяжении всего процесса разработки и валидации биоаналитической методики контролировали с помощью гигрометров психрометрических ВИТ-2 (ООО «Термоприбор», Россия). Температура окружающего воздуха в лабораториях в процессе исследования составляла 20-24 °С, влажность – 56-71 %.

Свидетельства о поверке всех средств измерений выданы ФБУ «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Томской области» (Томский ЦСМ).

2.3.2 Вспомогательное оборудование

Помимо средств измерений в работе важную роль играло вспомогательное оборудование, обеспечивающее значительный вклад в аналитическую процедуру.

При проведении пробоподготовки применяли следующее вспомогательное оборудование: для интенсивного перемешивания во время экстракции и во время растворения использовали лабораторный медицинский встряхиватель Vortex V-3 (Elmi, Латвия), для центрифугирования биообразцов при разделении водно-органической фазы после экстракции использовали настольную лабораторную микроцентрифугу Biofuge pico (Heraeus, Германия), для упаривания органической фазы использовали вакуумный концентратор UniEquip 100 ECH (Univapo, Германия).

Для приготовления воды очищенной в лаборатории использовали аквадистиллятор электрический АЭ-10МО (ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»).

Особое значение отводили чистоте посуды. Мерные колбы, цилиндры и пипетки обрабатывали в ультразвуковой мойке Elmasonic S 130 Н (Elma, Германия) при кипячении с высокоэффективным универсальным чистящим гелем «Шайн» (ООО «НПО СпецСинтез», Россия) с последующим многократным ополаскиванием водой очищенной.

Приготовление модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб и образцов плазмы крови добровольцев в исследовании биоэквивалентности, а также проведение всех процедур пробоподготовки осуществляли в центрифужных пластиковых микропробирках типа Эппендорф (Nuova Aptaca, Италия). Центрифужные микропробирки и наконечники к пипеточным дозаторам использовали однократно.

Образцы холостой плазмы крови человека, используемой в процессе разработки и валидации биоаналитической методики, а также образцы плазмы крови добровольцев, содержащие иматиниб после приема тестируемого и

референтного препаратов, хранили в низкотемпературном морозильнике MDF-U5386S (Sanyo, Япония) при температуре - 80 ± 2 °C.

2.4 Условия оценки влияния состава подвижной фазы на хроматографические характеристики пика иматиниба и разработки параметров его хроматографического определения

Разработку условий хроматографического анализа и условий пробоподготовки для биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека проводили экспериментально, учитывая при этом физико-химические свойства исследуемого соединения.

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.

Оценку влияния состава подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба и выбор условий его хроматографического определения проводили параллельно, используя при этом раствор субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл.

Условия пробоподготовки подбирали с учетом разработанных параметров хроматографического анализа, необходимой специфичности анализа, а также важнейшего параметра – степени извлечения вещества. Изменяли варьируемые параметры (рН, 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.

Раствора иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл готовили следующим образом. Около 0,01 г (точная навеска) субстанции иматиниба мезилата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 5 мл подвижной фазы А, перемешивали до полного растворения, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали. Затем 4,2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора подвижной фазой А до метки и перемешивали.

Из раствора иматиниба мезилата с концентрацией 0,1 мг/мл методом параллельно-последовательного разведения готовили 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.

Для приготовления модельных градуировочных растворов иматиниба в плазме крови человека в пластиковую центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл помещали 450 мкл плазмы крови и прибавляли 50 мкл исходного градуировочного раствора субстанции иматиниба мезилата соответствующей концентрации, каждый раствор перемешивали на встряхивателе Vortex при 2000 об/мин в течение 5 мин. Затем прибавляли ацетонитрил и тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex. К раствору прибавляли около 0,1-0,2 г натрия хлорида и вновь перемешивали на встряхивателе Vortex. Полученный раствор центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Водную фазу отбрасывали, а органическую упаривали досуха на вакуумном концентраторе при температуре 45 °С до получения сухого остатка. К сухому остатку прибавляли 500 мкл ПФ А, перемешивали на встряхивателе Vortex при 2000 об/мин в течение 5 мин и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость использовали для хроматографического анализа.

Значения объема прибавляемого экстрагента, времени перемешивания при экстракции и при разделении фаз, а также скорости перемешивания и рН среды

определяли в процессе исследования степени извлечения при выборе условий пробоподготовки.

2.5 Условия валидации биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека

Валидацию разработанной биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ проводили на основании «Руководства по экспертизе лекарственных средств. Том 1» (Россия, 2013) [104] и согласно требованиям руководств по валидации «Guideline on validation of bioanalytical methods» (EMA, Англия, 2009) [105] и «Guidance for Industry: Bioanalytical method validation» (FDA, США, 2001) [106] по следующим параметрам:

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

2.6 Условия анализа образцов плазмы крови добровольцев, содержащих иматиниб, в клиническом исследовании биоэквивалентности

2.6.1 Условия исследования биоэквивалентности

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).

Исследование препаратов выполняли в соответствии с утвержденным Минздравом Протоколом и Методическими указаниями Минздравсоцразвития «Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств» (Россия, 2008 г.) [107], а также документами действующего законодательства РФ [8, 108]. В качестве добровольцев участвовали 24 мужчины в возрасте от 18 до 45 лет, отобранные согласно критериям включения и невключения.

Проведенное исследование биоэквивалентности являлось открытым, рандомизированным, перекрестным, сравнительным, с двумя периодами однократного перорального введения препарата добровольцам и периодом отмывки продолжительностью 14 суток.

В процессе исследования осуществляли динамическое наблюдение за добровольцами. Проводили измерение частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, артериального давления. Утром, до приема пищи и введения препарата путем внутривенного катетера отбирали пробу крови для оценки исходного статуса. Через 30 мин после приема пищи добровольцем осуществлялся прием 4 капсул (400 мг) одного из препаратов, запивая 200 мл кипяченой воды комнатной температуры. 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.

2.6.2 Условия хроматографического определения иматиниба в образцах плазмы крови добровольцев

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. Перед анализом образцов плазмы крови каждого добровольца проводили анализ градуировочных растворов и строили градуировочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в плазме крови. По

полученному градуировочному графику определяли количественное содержание иматиниба в образцах плазмы крови добровольцев.

2.6.3 Расчет фармакокинетических параметров

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}). Сопоставление значений AUC_{0-72} с AUC_{∞} , в случае $AUC_{0-72} \geq 0,8 AUC_{\infty}$, свидетельствовало о том, что выбранный регламент фармакокинетического исследования обеспечивает необходимую надежность оценки биодоступности иматиниба. В качестве оценки относительной степени всасывания (f) лекарственного вещества использовали отношение $AUC_{0-\infty, T} / AUC_{0-\infty, R}$, а относительной биодоступности (f') исследуемого препарата по отношению к препарату сравнения – $AUC_{0-72}^T / AUC_{0-72}^R$. Относительную степень всасывания (f'') исследуемого препарата по отношению к препарату сравнения определяли отношением $C_{\max}^T / C_{\max}^R$.

Статистическая обработка была выполнена в соответствии с Методическими указаниями «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» (Москва, 2008) с помощью статистического пакета Microsoft Office Excel 2013. После проведения логарифмического преобразования фармакокинетические показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ

3.1 Разработка условий хроматографического определения иматиниба

В качестве основного оборудования жидкостный хроматограф Милихром А-02 был выбран не случайно. Ввиду оснащённости микроколоной, размеры которой составляют 75×2 мм, он обладает рядом преимуществ по сравнению с другими моделями других производителей. Главное – это использование сравнительно низкой скорости потока элюентов, равной 0,1 мл/мин, при этом расход растворителей сокращается в 3-10 раз. Для масштабных фармакокинетических исследований, в том числе исследований биоэквивалентности, предполагается огромное число анализируемых биологических образцов, что неизбежно приводит к загрязнению колонки. В случае микроколоны, чья цена ниже в 5-10 раз аналогичных колонок с длиной 150-250 мм, при загрязнении можно использовать другую подобную колонку, не подвергая использованную процедурум регенерации, которые, в свою очередь, полноценно не восстанавливают ее первоначальные свойства.

3.1.1 Изучение спектральных характеристик иматиниба

В связи с тем, что в литературных источниках для УФ-спектрофотометрического детектирования иматиниба методом ВЭЖХ используют различные длины волн, для выбора рабочей длины волны нами получен УФ-спектр водного раствора иматиниба мезилата с концентрацией 0,05 мг/мл на УФ/вид-спектрофотометре Lambda 14P (Perkin Elmer, Германия), представленный на рисунке 10.

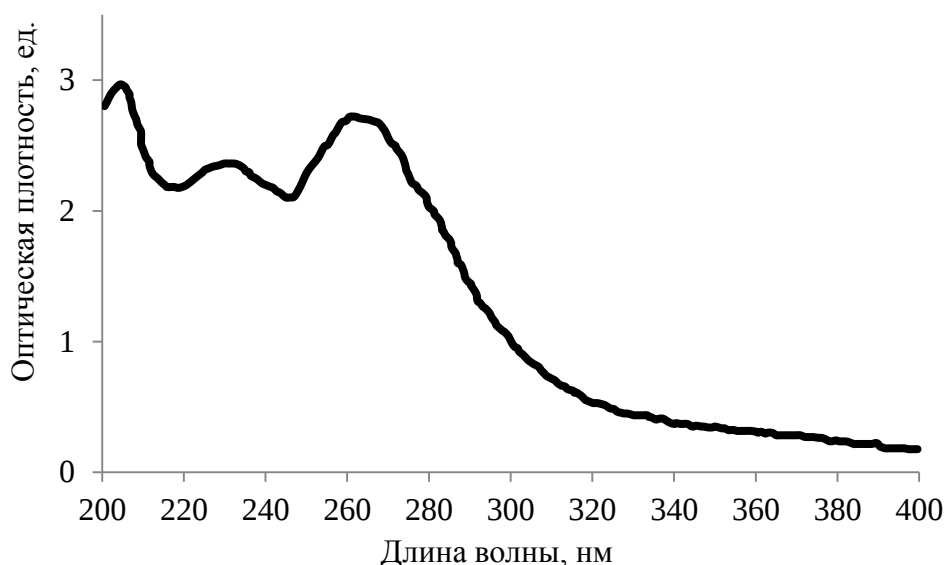


Рисунок 10 – УФ-спектр раствора субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 0,05 мг/мл

Из рисунка видно, что на УФ-спектре раствора иматиниба мезилата имеется два характерных максимума поглощения – при 230 нм и, более выраженный, при 260 нм. В качестве рабочей длины волны УФ-детектора жидкостного хроматографа использовали длину волны 260 нм, отвечающую наибольшей интенсивности поглощения на УФ-спектре раствора субстанции.

3.1.2 Обоснование выбора хроматографических параметров определения иматиниба

Хроматографическое разделение проводили при 35 °С, так как именно такое минимальное значение контролируемой температуры колонки можно установить в любое время года. Элюирование проводили при скорости потока 0,1 мл/мин, стандартной для колонки размером 75 × 2 мм и диаметром зерна 5 мкм. Объем вводимой пробы всегда составлял 20 мкл, потому как с помощью такого объема ввода на хроматографе Милихром А-02 при скорости потока 0,1 мл/мин можно достичь максимальной чувствительности с минимальным размытием хроматографической зоны аналита и отсутствием перегрузки колонки. Постоянная детектора составляла 0,36 с, что обеспечивало полноценную запись

хроматограммы и необходимое количество точек для интегрирования хроматографического пика определяемого соединения.

3.1.3 Влияние состава подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба

В процессе анализа использовали ступенчато-градиентный режим элюирования, в связи с тем, что только модель линейного изменения элюирующей силы растворителя способна обеспечить адекватное разделение за приемлемый промежуток времени многокомпонентной смеси (в нашем случае веществ плазмы крови человека), содержащей вещества с большим разбросом по временам удерживания [109]. В качестве органического растворителя с большей элюирующей силой применяли ацетонитрил, в котором иматиниб легко растворим (1 г в 2-3 мл). Хроматографический анализ начинали с меньшей доли ацетонитрила (5 %), постепенно элюируя водорастворимые эндогенные компоненты биологической матрицы. В ходе анализа состав элюентов меняли, содержание ацетонитрила увеличивали с 5 до 70 % за 10 мин для ускорения элюирования остальных компонентов плазмы крови и целевого аналита.

Ввиду того, что иматиниб обладает основными свойствами за счет содержания в своей структуре атомов азота пиридиновой, пиримидиновой, пиперазиновой и бензамидной групп, он представляет ряд соединений традиционно сложных для разделения посредством классических режимов ВЭЖХ [110]. Это объясняется частым уширением хроматографических пиков из-за существования сложных равновесных систем типа молекулярный ион – молекула – молекулярный ассоциат – молекулярный полиассоциат на поверхности сорбента. Каждая из этих форм ионогенного соединения имеет свое время удерживания, в результате хроматографический пик соединения уширяется, и создается впечатление полной потери эффективности хроматографической колонки [111].

Тем не менее, существует достаточно большое количество методов воздействия на хроматографическую систему, использующих динамическое

(адсорбционное) модифицирование, применение которого позволяет получать хорошие результаты при определении органических оснований и амфолитов [110]. Под динамическим модифицированием понимается введение в состав элюента различных компонентов, которые постоянно взаимодействуя с компонентами элюента и поверхностью сорбента, направленно меняют свойства хроматографической системы. Именно с помощью динамического модифицирования подвижной фазы проводили изучение хроматографического поведения иматиниба. В отличие от предварительного (химического) модифицирования, эти целевые добавки в элюенте присутствуют постоянно и непосредственно при протекании процесса разделения анализируемого вещества. С помощью введения модификаторов решали следующие задачи:

- устранение или уменьшение неоднородности свойств поверхности сорбента;
- подавление механизмов разделения, сопутствующих основному;
- значительное изменение липофильности (гидрофильности) поверхности сорбента;
- изменение механизма сорбции разделяемых соединений.

Добавка неорганической соли в элюент способствует увеличению ионной силы раствора, препятствующее протонизации оснований, что неизбежно увеличивает их гидрофобность, в связи с этим первоначально использовали в качестве подвижной фазы А 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного. За счет добавки этой неорганической соли пытались увеличить время удерживания адсорбата за счет эффекта «высаливания» органического соединения на границу раздела «адсорбент-элюент» и увеличения межфазного поверхностного натяжения «элюент-адсорбат», что и приведет к увеличению энергии взаимодействия «адсорбат-адсорбент».

Согласно литературным данным, максимальная концентрация иматиниба в плазме крови после приема препарата в дозе 400 мг составляет 1,8-2,1 мкг/мл [48-50], следовательно, такая концентрация должна соответствовать середине градуировочного графика разрабатываемой методики. Концентрация иматиниба в

растворе субстанции иматиниба мезилата, с помощью которого подбирали состав подвижной фазы, составляла 4200 нг/мл. Эта концентрация, предположительно, будет являться верхним пределом градуировочного графика, а у хроматографического пика, соответствующего максимальной концентрации, всегда наиболее максимальные значения фактора асимметрии и ширины.

Хроматограмма, полученная при анализе раствора субстанции иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл с помощью 0,5 % раствора калия фосфорнокислого однозамещенного в качестве подвижной фазы А и ацетонитрила в качестве подвижной фазы Б, представлена на рисунке 11.

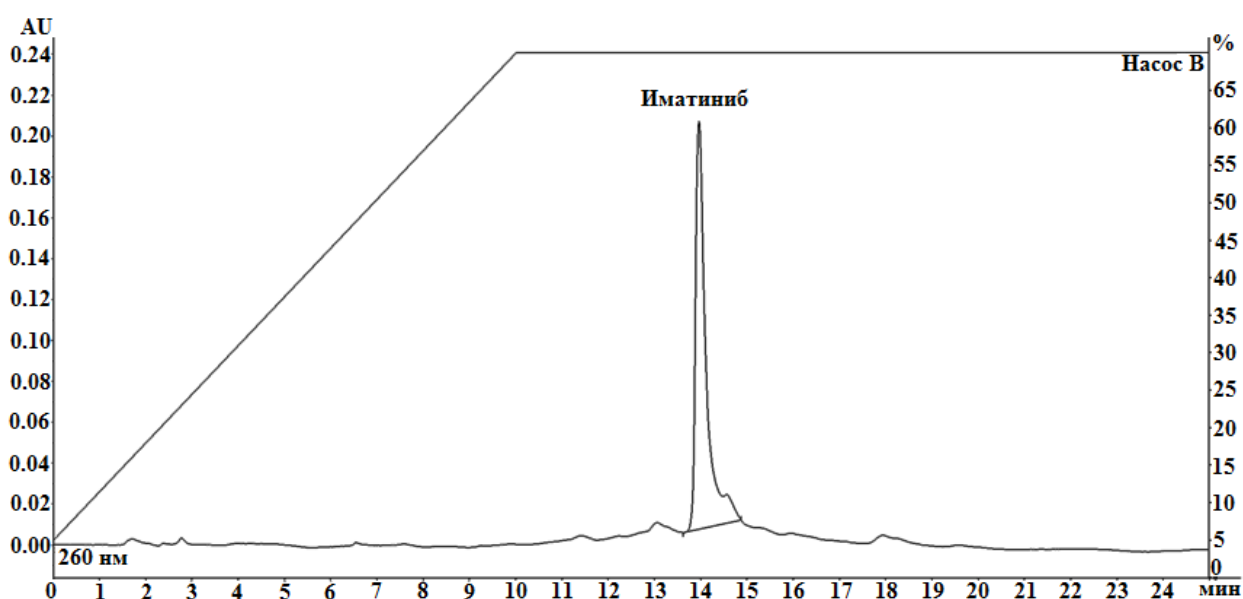


Рисунок 11 – Хроматограмма раствора иматиниба мезилата (4200 нг/мл) с подвижной фазой: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного, Б – ацетонитрил

Из рисунка видно, что хроматографический пик иматиниба широкий, а на заднем фронте имеется «пик-наездник», это свидетельствует о наличии нескольких ионных форм иматиниба в растворе при заданных условиях анализа. Время удерживания иматиниба составляет 14,09 мин, при оптимальном времени удерживания вещества в случае определения его в плазме крови равном 8-12 мин. Это связано с посторонними веществами биологической матрицы, элюирующимися при прямом градиенте и данной скорости потока в первые 7 мин. Эффективность разделения, рассчитанная по пику иматиниба, низкая

(13253 ТТ) для условий градиентного режима элюирования, объясняемая широким и асимметричным пиком анализатора (фактор асимметрии равен 3,22).

Ввиду того, что элюирование оснований в молекулярной форме на сорбентах с октадецилмодифицированным силикагелем при щелочных значениях pH среды невозможно из-за постепенного гидролиза привитых групп, осуществляли перевод анализатора в одну ионную форму. Смещение равновесия «молекулярная форма – ионная форма» адсорбата достигали путем подкисления элюента А. Подкисление элюента до pH равного 2,6-4,0 гарантирует, что все ионогенные соединения основного характера существуют в виде ионизированных соединений и сдвинуты в начало хроматограммы [111]. В качестве подкисляющего модификатора использовали ортофосфорную кислоту, что вместе с фосфатом калия создает буферную смесь со стабильным значением pH. Анализ проводили при различных значениях pH элюента А до получения минимального значения фактора асимметрии пика иматиниба. Зависимость фактора асимметрии пика иматиниба от значения pH подвижной фазы А представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Зависимость фактора асимметрии пика иматиниба от pH подвижной фазы А

Значение pH подвижной фазы А	Фактор асимметрии пика иматиниба					
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3	Анализ 4	Анализ 5	Среднее значение
4,0	2,28	2,31	2,19	2,24	2,27	2,26
3,9	2,17	2,18	2,23	2,23	2,22	2,21
3,8	2,21	2,15	2,17	2,20	2,14	2,17
3,7	2,14	2,09	2,13	2,11	2,12	2,12
3,6	2,03	2,06	2,08	2,01	2,02	2,04
3,5	1,91	1,89	1,95	1,94	1,95	1,93
3,4	1,83	1,87	1,81	1,85	1,86	1,84
3,3	1,72	1,74	1,74	1,71	1,70	1,72
3,2	1,75	1,75	1,71	1,72	1,72	1,73
3,1	1,71	1,74	1,72	1,77	1,75	1,74
3,0	1,75	1,72	1,78	1,76	1,77	1,76
2,9	1,74	1,72	1,76	1,76	1,74	1,74
2,8	1,72	1,77	1,74	1,73	1,77	1,75
2,7	1,81	1,78	1,76	1,80	1,77	1,78
2,6	1,77	1,77	1,73	1,76	1,75	1,76

Как видно из данных таблицы 1, наименьшее значение фактора асимметрии (1,72) пика иматиниба наблюдается при элюировании его с помощью подвижной фазы А с рН 3,3. Хроматограмма раствора иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл при элюировании с помощью подвижной фазы А с рН 3,3 представлена на рисунке 12.

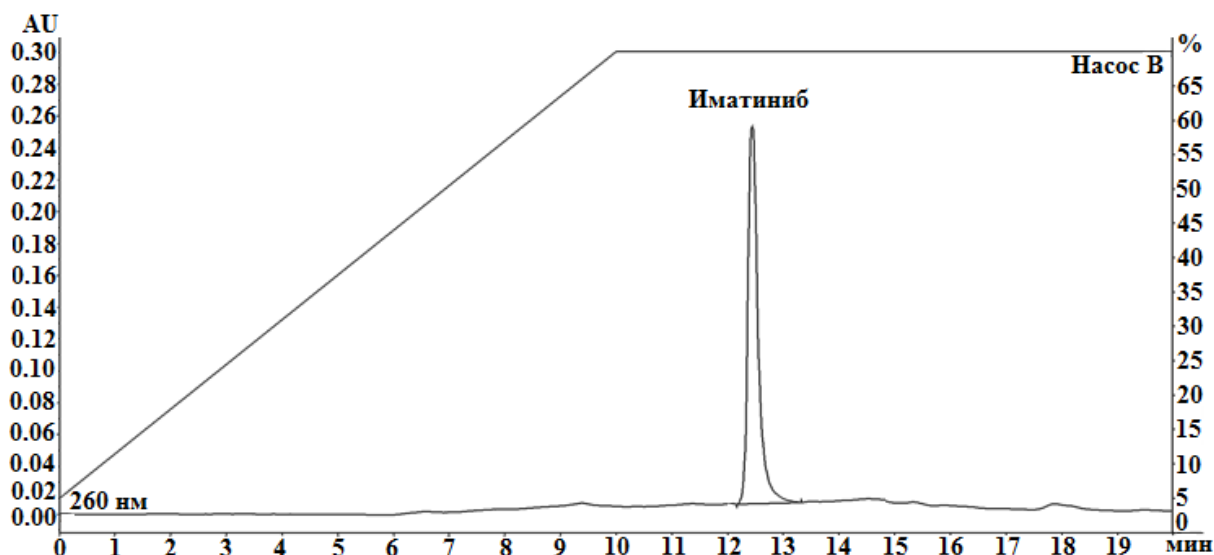


Рисунок 12 – Хроматограмма раствора иматиниба мезилата (4200 мкг/мл) с подвижной фазой: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного, рН=3,3; Б – ацетонитрил

Время удерживания (12,51 мин) уменьшилось за счет уменьшения удерживаемого объема соединения имеющего основной характер при добавлении кислоты. За счет исчезновения «пика-наездника» уменьшилась ширина пика иматиниба и увеличилась эффективность разделения, которая составляет 26757 ТТ. Полученное значение фактора асимметрии больше 1,5 и, следовательно, не соответствует требованиям.

Размывание хроматографической зоны иматиниба и, как следствие, размытый задний фронт его пика связаны с вторичными взаимодействиями «адсорбат-сорбент». Причиной таких вторичных взаимодействий являются остаточные силанольные группы сорбента, способные образовывать водородные связи с неподеленной парой электронов атомов азота в структуре иматиниба и оказывать значительный вклад в размывание хроматографической зоны. Для

подавления активности свободных силанольных групп сорбента использовали в качестве модификатора добавку триэтиламина (ТЭА) в подвижную фазу А в количестве 1 % по объему. Также для уменьшения времени удерживания иматиниба использовали добавку ацетонитрила в подвижную фазу А. После приготовления смеси 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – ацетонитрил – триэтиламин в пропорции 74:25:1 довели рН до значения 3,3 ортофосфорной кислотой. Хроматограмма раствора иматиниба мезилата с концентрацией 4200 нг/мл, полученная при анализе с помощью такой подвижной фазы, представлена на рисунке 13.

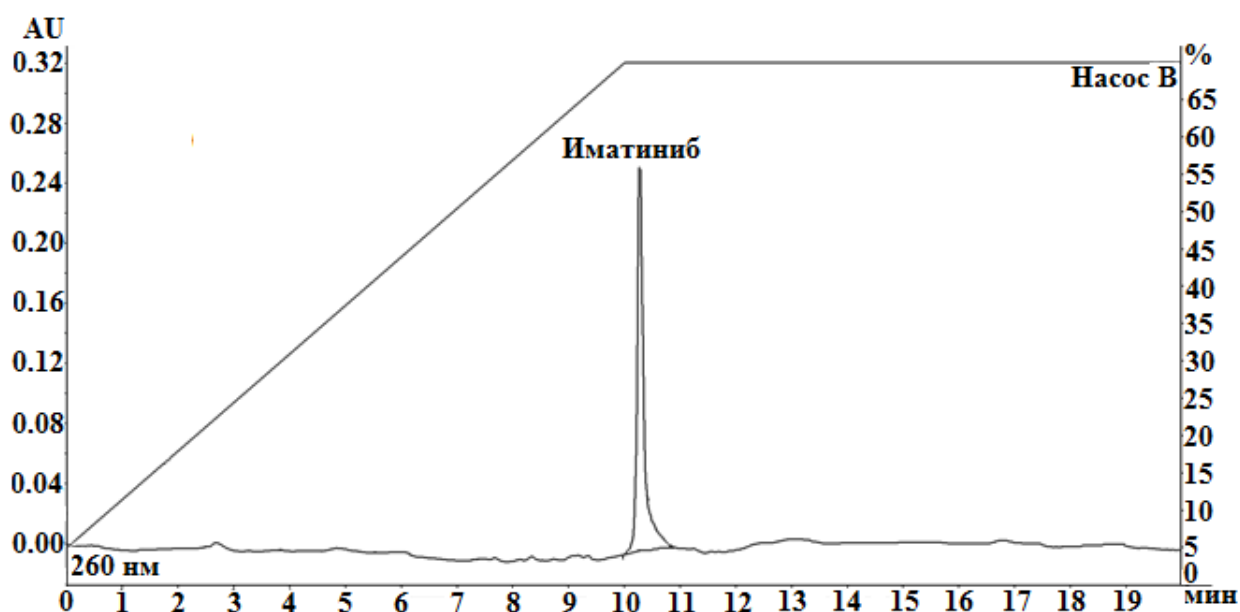


Рисунок 13 – Хроматограмма раствора иматиниба мезилата (4200 нг/мл) с подвижной фазой: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – ацетонитрил – ТЭА 74:25:1, рН=3,3; Б – ацетонитрил

Из рисунка видно, что ширина хроматографического пика иматиниба уменьшилась, как и уменьшилось время удерживания (10,26 мин) за счет добавки в элюент А растворителя с большей элюирующей силой. Эффективность разделения увеличилась и составляет 30101 ТТ, однако значение фактора асимметрии пика равно 1,54 и по-прежнему не соответствует требованиям.

При использовании градиентного режима хроматографирования, иматиниб элюируется из колонки при большей доле органического растворителя, который

смешиваясь с подвижной фазой А, меняет рН всей системы в большую сторону, что вновь способствует возникновению нескольких ионных форм иматиниба и приводит к размыванию заднего фронта его пика. Для проверки данного предположения вместо апротонного ацетонитрила в качестве подвижной фазы Б нами использован протонный растворитель – метанол, подкисленный ортофосфорной кислотой до рН 3,3. В подвижной фазе А ацетонитрил также заменили метанолом. Полученная хроматограмма представлена на рисунке 14.

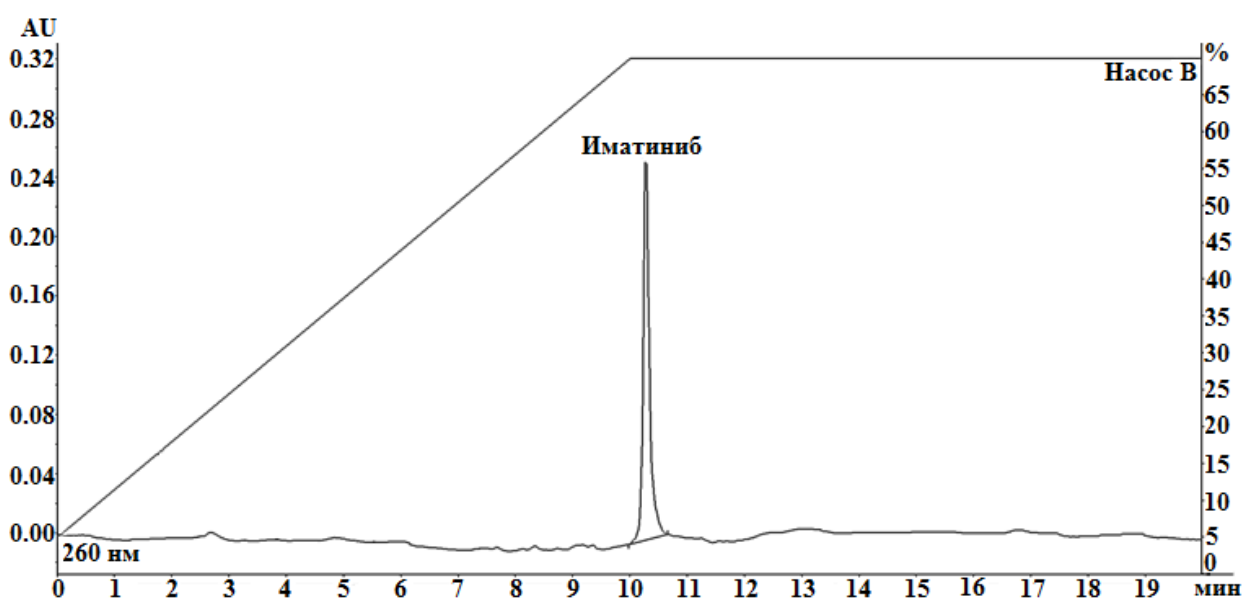


Рисунок 14 – Хроматограмма раствора иматиниба мезилата (4200 нг/мл) с подвижной фазой: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – метанол – ТЭА 74:25:1, рН=3,3; Б – метанол, рН=3,3

Благодаря снижению рН элюента Б получено минимальное значение фактора асимметрии пика иматиниба, равное 1,27 и максимальное значение эффективности разделения, которое составляет 43158 ТТ. Из рисунка также видно, что значительно уменьшилась ширина пика иматиниба, а время удерживания теперь составляет 10,03 мин.

Для проверки прямого влияния на значение фактора асимметрии пика иматиниба добавки триэтиламина проводили анализ раствора субстанции иматиниба мезилата без добавки ТЭА в подвижную фазу А. Полученная хроматограмма представлена на рисунке 15.

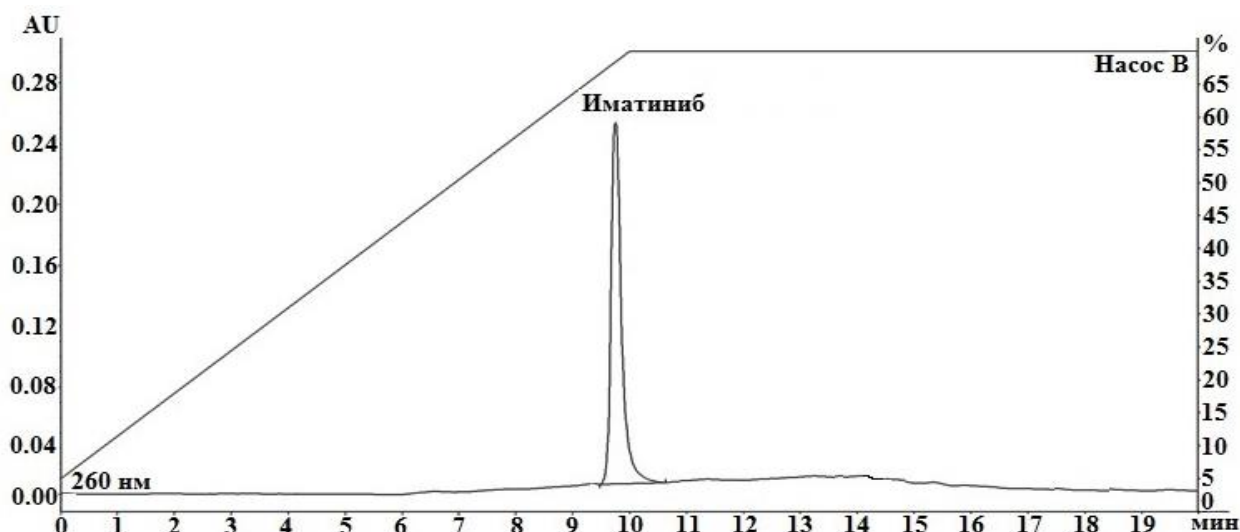


Рисунок 15 – Хроматограмма раствора иматиниба мезилата (4200 нг/мл) с подвижной фазой: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – метанол 75:25, рН=3,3; Б – метанол, рН=3,3

Из рисунка видно, что без добавления триэтиламина в подвижную фазу А задний фронт пика стал более размытым, значение фактора асимметрии увеличилось (1,61), за счет чего снизилась эффективность разделения (28496 ТТ), пик иматиниба вновь стал широким. Из полученных данных следует, что добавка триэтиламина оказывает прямое влияние на снижение фактора асимметрии пика иматиниба, что связано с дезактивацией силанольных групп сорбента и уменьшением размывания хроматографической зоны.

Зависимость хроматографических параметров пика иматиниба от состава подвижной фазы представлена в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что минимальные значения ширины и фактора асимметрии пика иматиниба и наибольшее значение эффективности разделения наблюдается при анализе раствора субстанции с помощью следующего состава подвижной фазы: А – 0,5 % раствор калия фосфорнокислого однозамещенного – метанол – ТЭА 74:25:1, рН=3,3; Б – метанол, рН=3,3.

Таблица 2 – 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

3.2 Разработка методики пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба

Как упоминалось ранее, в качестве пробоподготовки при извлечении иматиниба из биологической матрицы в известных работах используют метод осаждения белков [7, 88-91, 96-97] и твердофазную экстракцию (ТФЭ) [93-95, 98]. Обычно при осаждении белков не удается полноценно избавиться от эндогенных соединений плазмы крови (жиров, липидов и др.) и, следовательно, матричного эффекта, мешающего селективности определения, вследствие наличия множества пиков на хроматограмме аналита [7, 96]. Использование метода жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) при анализе нескольких сотен, а иногда и тысяч образцов плазмы крови добровольцев в исследовании биоэквивалентности

является более экономичным, чем применение картриджей ТФЭ. В связи с этим, нами был выбран метод жидкостно-жидкостной экстракции 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 метода осаждения белков, при экстракции ацетонитрилом 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.

Процедуру приготовления модельного образца плазмы крови человека, содержащего иматиниб, осуществляли следующим образом. В пластиковую центрифужную микропробирку Эппендорф вместимостью 2 мл помещали 450 мкл нативной (холостой) плазмы крови человека, такой объем был выбран из учета удобства пересчета концентрации иматиниба и возможности экстракции без переноса в другую емкость. Прибавляли 50 мкл исходного градуировочного раствора субстанции иматиниба мезилата соответствующей концентрации и тщательно перемешивали на встряхивателе Вортекс при средней скорости 2000 об/мин в течение 5 мин. Затем прибавляли ацетонитрил и тщательно перемешивали на встряхивателе Вортекс. Для разделения водно-органической фазы прибавляли 0,1-0,2 г натрия хлорида и тщательно перемешивали на встряхивателе Вортекс. Помещали микропробирку в центрифугу и полученную смесь центрифугировали при максимальной скорости 13000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования отбирали органическую фазу и упаривали ее на вакуумном концентраторе при 45 °С до сухого остатка. К сухому остатку

прибавляли 500 мкл подвижной фазы А и перемешивали на встряхивателе Вортекс при средней скорости 2000 об/мин в течение 5 мин. Полученный раствор центрифугировали при максимальной скорости 13000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость использовали для хроматографического определения согласно разработанным условиям.

Для подтверждения специфичности анализа и отсутствия наложения веществ матрицы на пик определяемого компонента готовили и анализировали холостой образец плазмы крови человека без добавления исходного градуировочного раствора субстанции иматиниба мезилата, вместо него в холостую плазму крови вносили 50 мкл воды очищенной.

Хроматографический пик вещества из биологической матрицы может быть наложен на пик определяемого компонента, не изменяя при этом хроматографические параметры основного пика. Этот эффект чаще всего происходит при высокой концентрации определяемого вещества и низкой концентрации вещества из матрицы. Поэтому, дополнительно, для предотвращения такого явления запись хроматограммы при анализе биологических образцов проводили на двух длинах волн – 260 и 230 нм и определяли соотношение площадей пиков, рассчитанных при двух разных длинах волн, которое, согласно максимумам поглощения на УФ-спектре раствора субстанции, должно составлять около 1,15. Идентификацию иматиниба в плазме крови проводили по значению времени удерживания ($10,03 \pm 0,1$ мин) и спектральному соотношению при длинах волн 260 и 230 нм. Расчет количественного содержания иматиниба проводили по значению площади пика при длине волны 260 нм, соответствующей максимальному аналитическому сигналу.

Пример хроматограммы холостого образца плазмы крови представлен на рисунке 16, пример хроматограммы иматиниба в плазме крови с концентрацией 4200 нг/мл на рисунке 17.

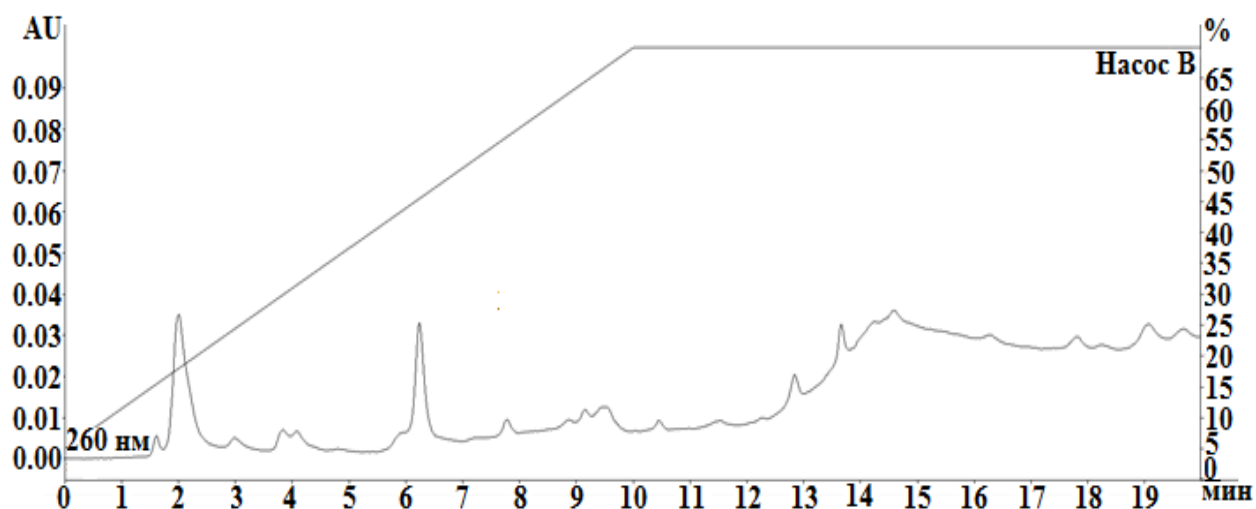


Рисунок 16 – Хроматограмма холостого образца плазмы крови человека

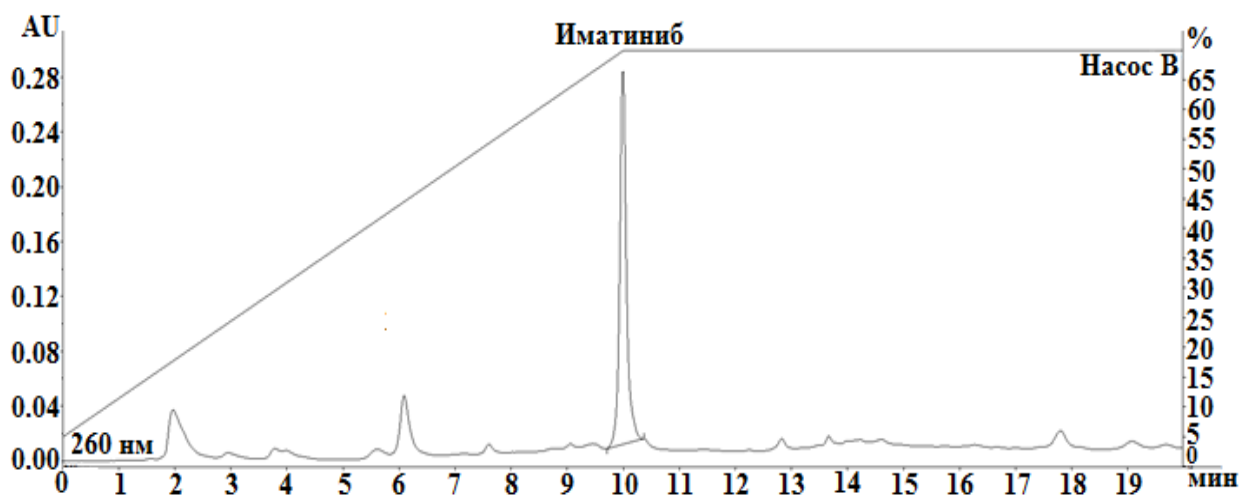


Рисунок 17 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови человека с
концентрацией 4200 нг/мл

На хроматограмме холостого образца плазмы крови не наблюдается пиков веществ, совпадающих по времени удерживания с пиком определяемого вещества на хроматограмме иматиниба в плазме крови человека. Хроматографические параметры пика иматиниба в плазме крови человека с концентрацией 4200 нг/мл представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Хроматографические параметры пика иматиниба в плазме крови человека с концентрацией 4200 нг/мл

№ анализа	Время удерживания, мин	Эффективность, ТТ	Разрешение	Асимметрия
1	10,03	36854	2,51	1,35
2	10,03	37764	2,54	1,37
3	10,04	41094	2,56	1,28
4	10,04	38108	2,43	1,38
5	10,04	37788	2,52	1,26
6	10,06	38606	2,48	1,27

Из таблицы 3 следует, что разрешение между пиками иматиниба и ближайшим пиком постороннего вещества плазмы крови составляет в среднем 2,5, что больше требуемого значения, равного 2,0, следовательно, не требуется дополнительной корректировки условий градиентного элюирования или скорости потока для улучшения специфичности методики.

Для получения максимальной степени извлечения иматиниба из биологической матрицы поочередно изменяли такие условия пробоподготовки, как рН среды, объем экстрагента, скорость и время перемешивания при экстракции, время перемешивания при разделении фаз натрия хлоридом, определяя степень извлечения (%) по формуле (1):

$$R = \frac{S_2}{S_1} \cdot 100 \quad (1)$$

где: S_2 – площадь пика иматиниба в плазме крови;

S_1 – площадь пика иматиниба в растворе субстанции аналогичной концентрации.

Исследование степени извлечения проводили с помощью раствора субстанции иматиниба мезилата и модельного образца плазмы крови, содержащего иматиниб с концентрацией, соответствующей предполагаемому максимуму динамического диапазона методики – 4200 нг/мл.

Исследование зависимости степени извлечения иматиниба от рН среды проводили при максимальной скорости перемешивания, равной 4000 об/мин и

времени перемешивания при экстракции и разделении фаз, равном 10 мин. Кислые значения pH среды получали путем прибавления к образцам плазмы крови 20 % раствора ортофосфорной кислоты, щелочные значения – 20 % раствора натрия гидроксида. График зависимости степени извлечения от pH среды представлен на рисунке 18.

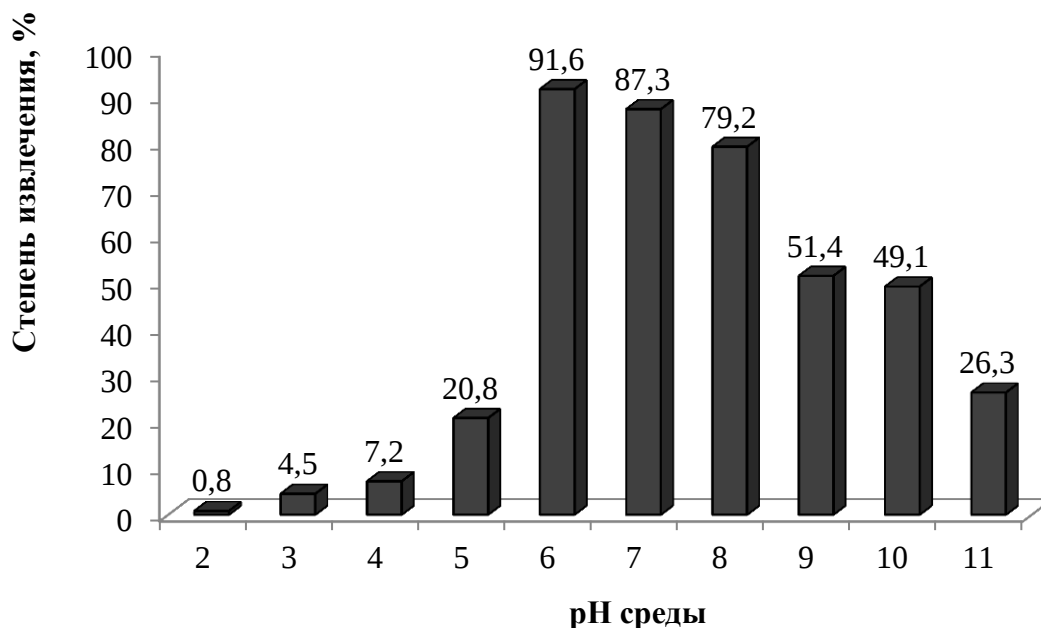


Рисунок 18 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от pH среды в процессе пробоподготовки

Из графика видно, что максимальная степень извлечения иматиниба из плазмы крови человека наблюдается при pH 6 в процессе пробоподготовки, что послужило основанием для дальнейших исследований при таком значении pH среды.

Нами проведено исследование влияния объема используемого экстрагента (ацетонитрила) на степень извлечения иматиниба из плазмы крови. pH среды во время эксперимента был равен 6, скорость перемешивания максимальной – 4000 об/мин, время перемешивания – 10 мин. График зависимости степени извлечения от объема экстрагента в процессе экстракции представлен на рисунке 19.

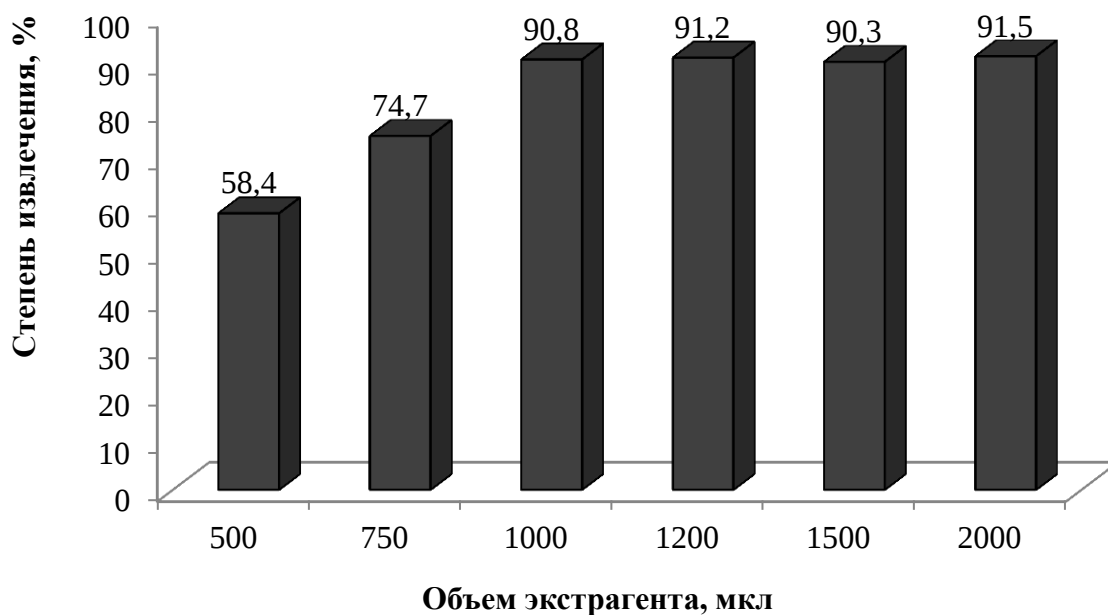


Рисунок 19 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от объема экстрагента в процессе экстракции

Из рисунка 19 видно, что максимальная степень извлечения иматиниба из плазмы крови человека достигается при проведении экстракции, в которой объем прибавляемого экстрагента составляет 1000 мкл. Дальнейшее увеличение объема экстрагента не влияет на значение степени извлечения, следовательно, целесообразно использовать объем экстрагента, равный 1000 мкл.

Далее нами оценено влияние на степень извлечения скорости перемешивания образцов при экстракции и при разделении фаз. Время перемешивания составляло 10 мин, pH среды был равен 6, объем экстрагента – 1000 мкл. График зависимости степени извлечения от скорости перемешивания в процессе экстракции представлен на рисунке 20.



Рисунок 20 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от скорости перемешивания в процессе экстракции

По результатам эксперимента установлено, что перемешивание при скорости, равной 4000 об/мин способствует получению максимального значения степени извлечения иматиниба из плазмы крови человека, в связи с этим процесс экстракции будет производиться при данной скорости перемешивания.

Следующим параметром методики пробоподготовки являлось время перемешивания. Использовали при этом уже найденные оптимальные параметры: рН среды, равный 6, объем экстрагента – 1000 мкл, скорость перемешивания – 4000 об/мин. Отдельно изучали влияние на степень извлечения иматиниба времени перемешивания при экстракции и при разделении фаз. График зависимости степени извлечения иматиниба от времени перемешивания при экстракции ацетонитрилом представлен на рисунке 21.

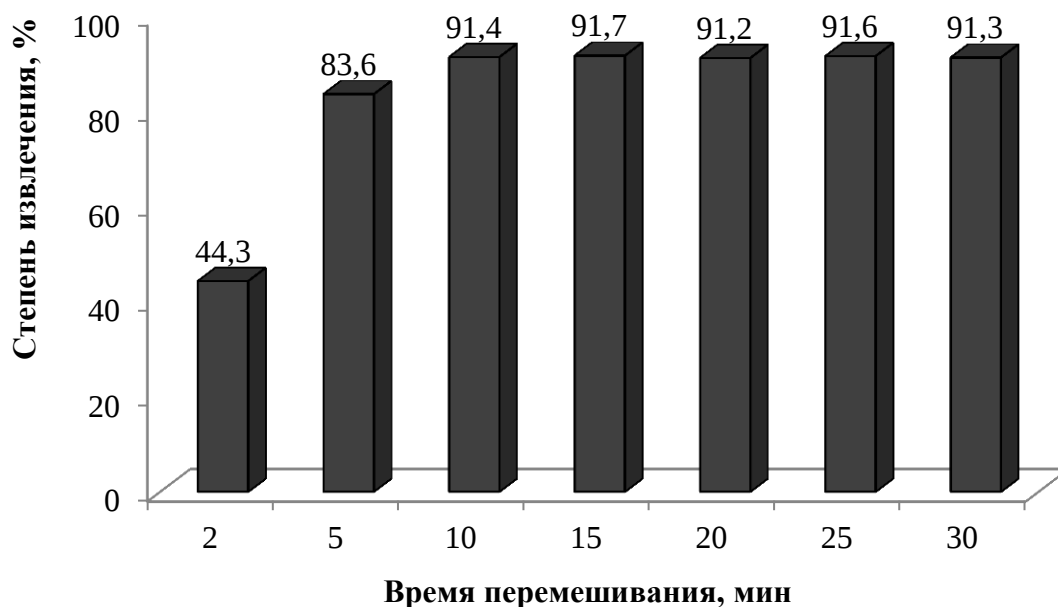


Рисунок 21 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от времени перемешивания в процессе экстракции

Из графика видно, что в процессе экстракции при перемешивании в течение 10 мин наблюдается максимальная степень извлечения иматиниба из плазмы крови человека, дальнейшее увеличение времени перемешивания не ведет к увеличению степени извлечения, следовательно, нецелесообразно проводить процесс экстракции при времени, превышающем 10 мин.

График зависимости степени извлечения иматиниба от времени перемешивания при разделении фаз с помощью добавки натрия хлорида представлен на рисунке 22.

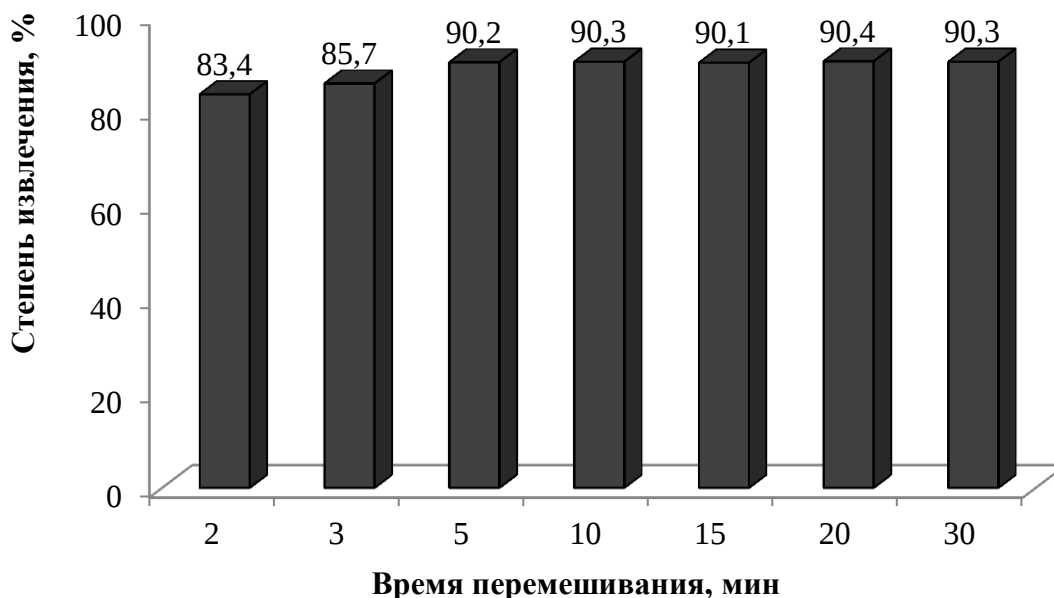


Рисунок 22 – График зависимости степени извлечения (%) иматиниба из плазмы крови человека от времени перемешивания в процессе разделения фаз

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

- pH 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 человека для хроматографического определения иматиниба, представленный на рисунке 23.

Таким образом, изучено влияние модификаторов подвижной фазы на хроматографические параметры пика иматиниба. Показано, что применение калия фосфорнокислого однозамещенного, ортофосфорной кислоты и триэтиламина в качестве модификаторов подвижной фазы А и Б способствует уменьшению размывания хроматографической зоны иматиниба. Разработаны условия

хроматографического анализа раствора субстанции иматиниба, включающие состав подвижной фазы,

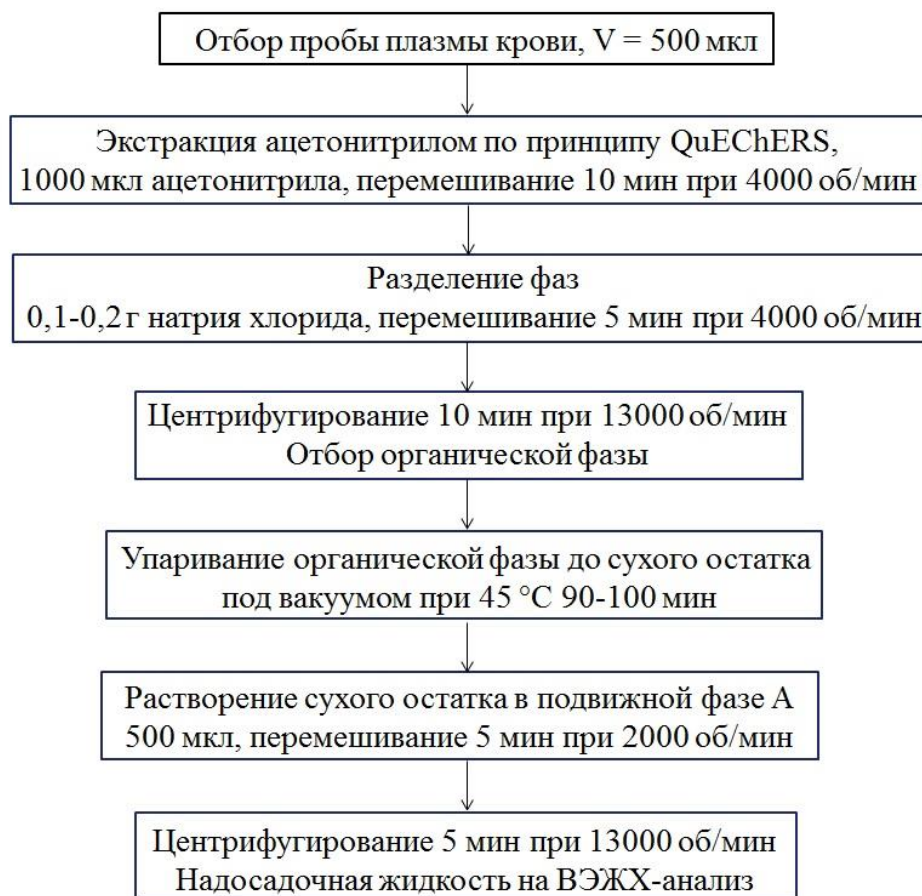


Рисунок 23 – Алгоритм пробоподготовки образцов плазмы крови человека для хроматографического определения иматиниба

условия градиентного режима элюирования, температуру разделения, скорость потока, постоянную времени детектора, объем вводимой пробы и длину волны УФ-детектирования, позволяющие получать на хроматограмме узкий и симметричный пик иматиниба с высокой эффективностью разделения. 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.

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. Акт внедрения методики представлен в Приложении 2.

3.3 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.

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

Количественное определение иматиниба в плазме крови человека проводят в следующих условиях:

Хроматограф	– Милихром А-02 (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия);
Колонка	– 75 × 2 мм с октадецил-модифицированным силикагелем (C ₁₈), 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 pH 3,3; – Б – метанол, pH=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 градуировочным графикам.

ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И РАСЧЕТ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Нет сомнений в том, что валидация является основным условием обеспечения качества и достоверности результатов всех аналитических исследований. Согласно международному стандарту ISO/IEC 17025, «валидация методики» – это «подтверждение путем исследования и представления объективных доказательств того, что конкретные требования к специфическому целевому использованию методики выполняются». Это означает, что при помощи методики, прошедшей валидацию, при правильном ее применении можно получать результаты, приемлемые для лица, принимающего решения на их основании. Процесс валидации методики представляет собой ряд запланированных экспериментов, в ходе которых определяют ее рабочие характеристики [112-114].

Считается, что валидация методики тесно связана с ее разработкой. Большая часть рабочих характеристик методики, имеющих отношение к валидации, как правило, оцениваются (по меньшей мере, приблизительно) в процессе ее разработки. Тем не менее, следует иметь в виду, что формальная валидация итоговой версии методики (документированной процедуры) должна быть произведена [112].

4.1 Проверка пригодности хроматографической системы

Перед началом процедуры валидации разработанной биоаналитической методики проводили проверку пригодности хроматографической системы по основным характеристикам хроматографического пика определяемого компонента, установленным в процессе разработки и оптимизации методики. Ее цель – проверка того, что разрешение (разделяющая способность) и прецизионность аналитических сигналов (площадей пиков) хроматографической системы адекватны для выполнения анализа; при этом основываются на

концепции, что оборудование, электроника, аналитические операции и анализируемые образцы составляют единую систему, которую можно исследовать как целое [115]. Так как биоаналитическая методика предполагает определение низких концентраций, одним из обязательных контролируемых параметров являлась чувствительность хроматографической системы.

Процедуру проверки пригодности хроматографической системы в дальнейшем проводили перед началом каждого аналитического цикла измерений. Если результаты определения были бы получены без подтверждения пригодности хроматографической системы, они считались бы недостоверными.

Для проверки пригодности хроматографической системы выполняли так называемый тест пригодности хроматографической системы: анализировали раствор, специально предназначенный для данного теста, и проверяли соответствие полученных результатов требованиям пригодности хроматографической системы.

В настоящее время в литературе до сих пор нет устоявшегося мнения о том, какие критерии пригодности хроматографической системы (тестируемые характеристики и их допустимые значения) следует приводить в требованиях к пригодности хроматографической системы. В связи с этим, в качестве критериев пригодности хроматографической системы для количественного определения иматиниба в плазме крови человека включены все наиболее важные параметры хроматографического пика, такие как время удерживания, разрешение, эффективность разделения, фактор асимметрии, соотношение сигнал/шум, относительное стандартное отклонение площадей пика. В результате, перекрываются все 4 группы критериев, указанные в Европейской, Британской и Американской Фармакопеях, которые могут потребоваться для обеспечения пригодности хроматографической системы:

- 1) критерии разделяющей способности хроматографической системы;
- 2) критерии, связанные с надежностью определения точек начала, конца и высоты пиков (характеристики формы пиков);
- 3) критерии достоверного обнаружения пиков;

4) статистические критерии воспроизводимости аналитических сигналов.

В качестве требований к критическим параметрам использовали требования ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография» в Государственной Фармакопее РФ XIII издания. Разрешение между пиком иматиниба и ближайшим посторонним пиком должно составлять не менее 2,0, фактор асимметрии не более 1,5, относительное стандартное отклонение площадей пиков не более 2 %. Особенности методики определялись следующие критерии: время удерживания, которое должно составлять $10,03 \pm 0,1$ мин, эффективность разделения, которая должна составлять не менее 30000 теоретических тарелок и соотношение сигнал/шум для пика иматиниба в растворе для проверки пригодности хроматографической системы, которое должно быть не менее 1200/1.

Параметры хроматографического пика иматиниба при анализе раствора для проверки пригодности хроматографической системы представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Параметры хроматографического пика иматиниба при анализе раствора для проверки пригодности хроматографической системы

№ анализа	Время удерживания, мин	Площадь пика, AU*мкл	Эффективность, ТТ	Разрешение	Фактор асимметрии	Соотношение сигнал/шум
1	10,03	4,268	36746	2,49	1,42	1457/1
2	10,07	4,205	40414	2,45	1,34	1408/1
3	10,06	4,181	43681	2,52	1,41	1416/1
4	10,03	4,237	36854	2,57	1,45	1418/1
5	10,03	4,152	37764	2,52	1,37	1426/1
6	10,04	4,082	41094	2,56	1,28	1403/1
7	10,04	4,181	38108	2,54	1,38	1385/1
8	10,05	4,134	39653	2,53	1,46	1387/1
9	10,07	4,217	42894	2,49	1,36	1429/1
10	10,03	4,105	40102	2,56	1,31	1391/1
Среднее значение	10,05	4,176 RSD=1,4 %	39731	2,52	1,38	1412
Требуемое значение	$10,03 \pm 0,1$ мин	$RSD \leq 2 \%$	Не менее 30000	Не менее 2,0	Не более 1,5	Не менее 1200/1

Из таблицы 4 видно, что все параметры хроматографического пика иматиниба соответствуют требованиям, предъявляемым к критериям пригодности хроматографической системы. После проведения теста пригодности

хроматографической системы результаты последующего определения всего аналитического цикла были признаны достоверными.

4.2 Оценка специфичности методики

Первым валидируемым параметром биоаналитической методики являлась специфичность. Специфичность – это способность методики однозначно определять исследуемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов матрицы. Доказательство специфичности методики обычно основывается на использовании данных анализа модельных смесей известного состава, полученных с помощью данной методики. Важно было убедиться в том, что измеряемая характеристика (площадь пика) связана исключительно с аналитом, и не имеет отношения к веществам с аналогичными физическими или химическими свойствами, а также не является следствием взаимодействия, вызывающего смещение результатов измерений.

Важнейшим параметром при установлении специфичности является разрешение между пиком аналита и ближайшим посторонним пиком, которое должно составлять не менее 2,0. При таком разрешении вероятность надежного определения точек начала, конца и высоты пика аналита максимальна. Разрешение наиболее полно характеризует разделяющую способность хроматографической системы, поэтому его контролируют и при проверке пригодности хроматографической системы.

Для валидируемой методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием оценивали ее специфичность в отношении определяемого вещества, т. е. экспериментально подтверждали, что присутствие сопутствующих компонентов матрицы не влияет непредусмотренным образом на результат анализа.

Для оценки специфичности проанализированы 6 образцов холостой плазмы крови человека от различных добровольцев, подвергнутых процедуре пробоподготовки согласно разработанной биоаналитической методики, и 6 модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с

концентрацией 4200 нг/мл. На хроматограммах холостых образцов плазмы крови человека отсутствуют пики, совпадающие по времени удерживания с пиком иматиниба на хроматограммах модельных образцов плазмы крови, содержащих иматиниб. Значения разрешения хроматографического пика иматиниба в модельных образцах плазмы крови, содержащих определяемое вещество, представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Значения разрешения хроматографического пика иматиниба в модельных образцах плазмы крови человека

№ образца	Время удерживания, мин	Разрешение
1	10,03	2,51
2	10,03	2,54
3	10,04	2,56
4	10,04	2,43
5	10,04	2,52
6	10,06	2,48

Из данных таблицы 5 следует, что при количественном определении иматиниба в плазме крови человека достигнуто оптимальное хроматографическое разделение, разрешение между пиками иматиниба и ближайшим посторонним пиком матрицы составляет более 2,5. Следовательно, методика обладает достаточной специфичностью для избирательного количественного определения иматиниба в плазме крови человека.

4.3 Определение предела обнаружения методики

Предел обнаружения – это наименьшее количество (концентрация) исследуемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидируемой методики. Предел обнаружения обычно выражается как концентрация определяемого вещества.

Для установления предела обнаружения иматиниба в плазме крови человека, согласно разработанной методики, использовали соотношение сигнал/шум. 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. Сравнивали величины сигналов, пределом обнаружения считали концентрацию, для которой соотношение сигнал/шум составляет не менее 3:1.

Наиболее распространенным методом количественного определения шума является измерение размаха «от пика к пику» [113]. Этот метод наглядно иллюстрируется на рисунке 24.

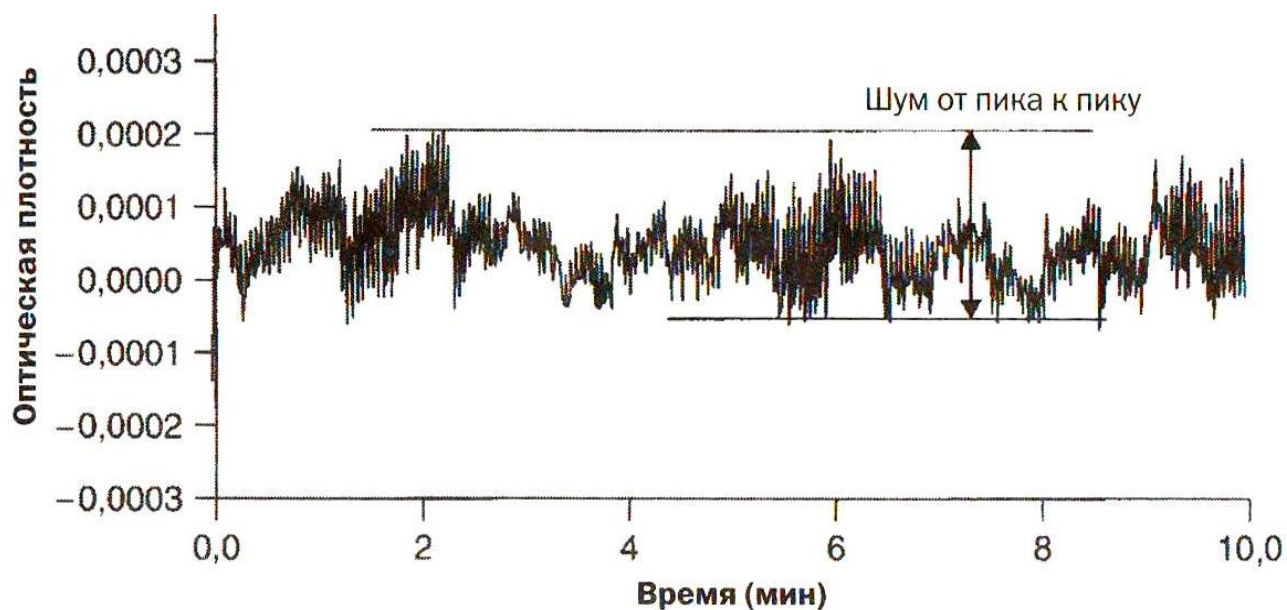


Рисунок 24 – Размах шума «от пика к пику»

Он заключается в нанесении двух параллельных линий на протяжении необходимого периода времени с последующим измерением максимального расстояния.

Иногда ситуация может осложняться смещением базовой линии. Такой пример приведен на рисунке 25.

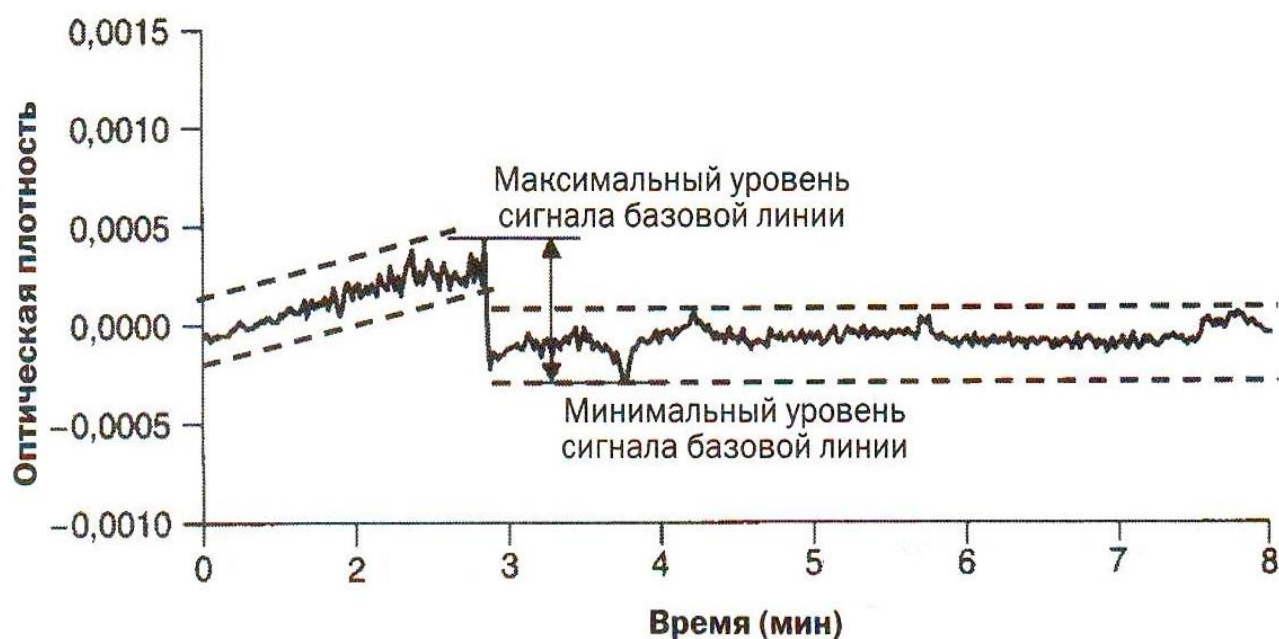


Рисунок 25 – Смещение базовой линии и размах шума «от пика к пику»

В подобном случае невозможно корректно оценить шум измерением расстояния между максимальной и минимальной его точками, поскольку при этом не будет учитываться смещение базовой линии. Поэтому при возникновении такой ситуации оценивали значение размаха для каждого отдельного участка (как показано пунктирными линиями на рисунке 25).

Пример хроматограммы холостой плазмы крови представлен на рисунке 26, хроматограммы иматиниба в модельном образце плазмы крови человека с концентрацией 10 нг/мл на рисунке 27. Результаты расчета соотношения сигнал/шум для пика иматиниба в плазме крови с концентрацией 10 нг/мл приведены в таблице 6.

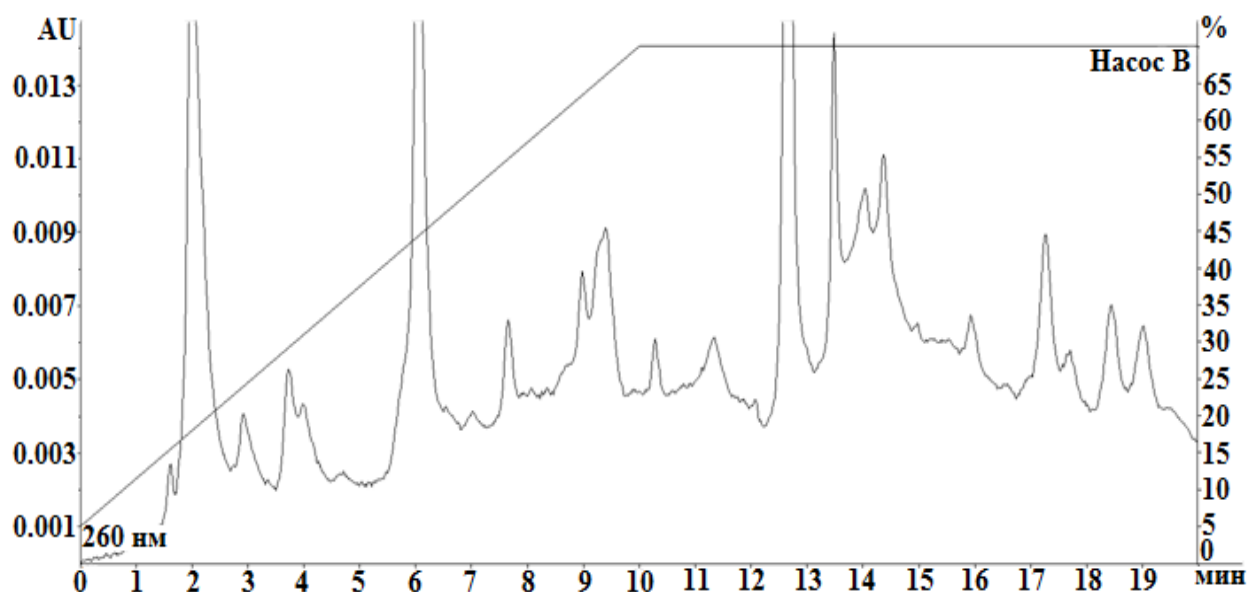


Рисунок 26 – Хроматограмма холостой плазмы крови человека

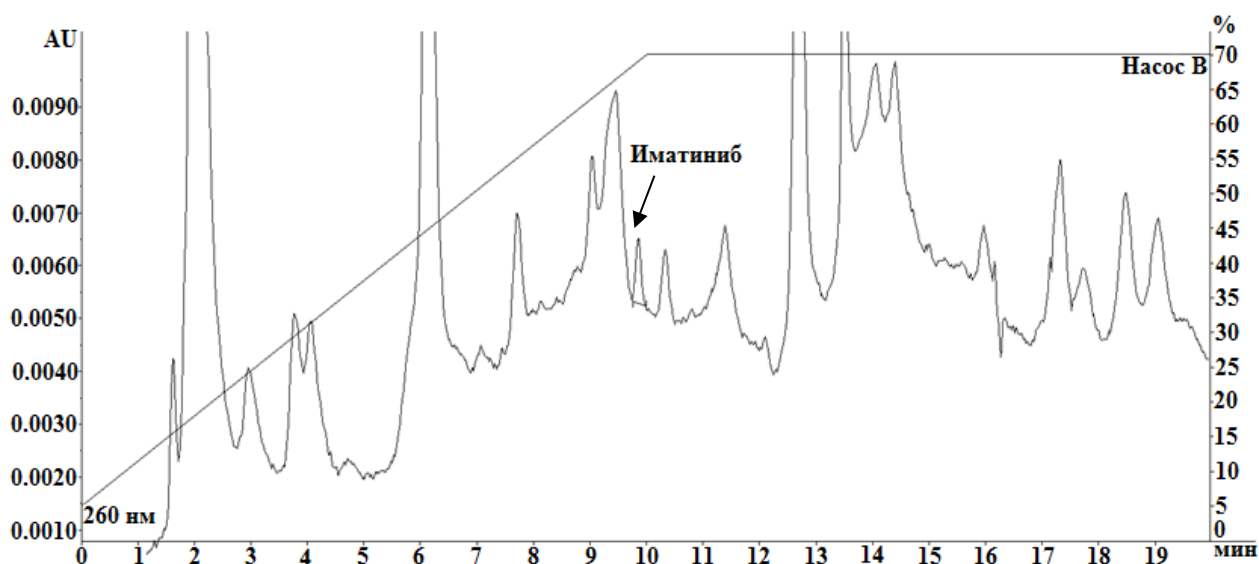
Рисунок 27 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови человека с
концентрацией 10 нг/мл

Таблица 6 – Результаты расчета соотношения сигнал/шум для пика иматиниба в плазме крови с концентрацией 10 нг/мл.

№ анализа	Высота пика иматиниба (AU)	Уровень шума(AU)	Соотношение сигнал/шум	Среднее значение соотношения сигнал/ шум
1	0,0007	0,0002	3,5/1	3,6/1
2	0,0007	0,0002	3,5/1	
3	0,0008	0,0002	4/1	
4	0,0006	0,0002	3/1	
5	0,0007	0,0002	3,5/1	
6	0,0008	0,0002	4/1	

Из таблицы 6 следует, что 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.

4.4 Установление нижнего предела количественного определения методики

Нижний предел количественного определения – это та концентрация вещества в образце, при которой его можно количественно оценить с требуемой правильностью и прецизионностью. Нижний предел количественного определения является обязательной валидационной характеристикой методик, используемых для оценки малых количеств (концентраций) веществ в образце.

Для установления нижнего предела количественного определения иматиниба в плазме крови человека по соотношению сигнал/шум анализировали холостой образец плазмы крови человека и определяли уровень шума, затем анализировали модельные образцы плазмы крови человека с концентрацией, превосходящей предел обнаружения примерно в 3 раза, и устанавливали уровень (интенсивность) сигнала аналита. Сравнивали величины сигналов, нижним пределом количественного определения считали концентрацию, для которой соотношение сигнал/шум составляет не менее 10/1. Пример хроматограммы иматиниба в модельном образце плазмы крови человека с концентрацией 30 нг/мл представлен на рисунке 28. Результаты оценки соотношения сигнал/шум для пика иматиниба в плазме крови с концентрацией 30 нг/мл приведены в таблице 7.

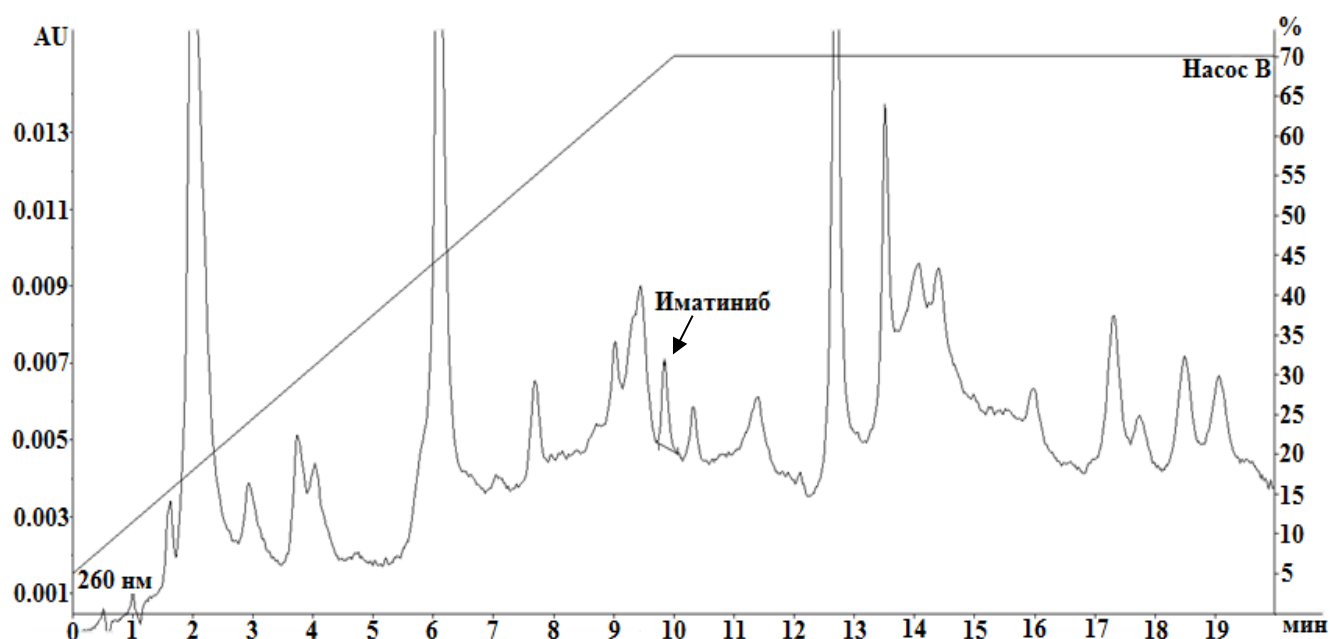


Рисунок 28 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови человека
с концентрацией 30 нг/мл

Таблица 7 – Результаты расчета соотношения сигнал/шум для пика иматиниба
концентрацией 30 нг/мл

№ анализа	Высота пика иматиниба (AU)	Уровень шума (AU)	Соотношение сигнал/шум	Среднее значение соотношения сигнал/ шум
1	0,0023	0,0002	11,5/1	10,7/1
2	0,0021	0,0002	10,5/1	
3	0,0022	0,0002	11/1	
4	0,0021	0,0002	10,5/1	
5	0,0021	0,0002	10,5/1	
6	0,0021	0,0002	10,5/1	

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.

4.5 Изучение линейности методики

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой

пробе в пределах аналитической области методики. При валидации методики экспериментально проверяли ее линейность в аналитической области путем измерения аналитических сигналов для проб с различными концентрациями определяемого вещества.

Зависимость площади пика иматиниба от его концентрации в плазме крови человека 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. В программе Microsoft Office Excel 2003 строили градуировочную зависимость площади пика иматиниба от его концентрации в плазме крови. Результаты анализа модельных градуировочных растворов иматиниба в плазме крови представлены в таблице 8, параметры градуировочных зависимостей приведены в таблице 9. Усредненный градуировочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в модельном образце плазмы крови человека приведен на рисунке 29.

Таблица 8 – Результаты анализа 3-х серий модельных градуировочных растворов иматиниба в плазме крови человека

Концентрация иматиниба в модельном образце плазмы крови человека, нг/мл	Площадь пика иматиниба, AU*мкл			
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее значение
30	0,015	0,016	0,015	0,015
60	0,042	0,041	0,044	0,042
90	0,072	0,068	0,069	0,070
180	0,147	0,159	0,162	0,156
420	0,336	0,371	0,387	0,365
840	0,722	0,735	0,713	0,723
1680	1,547	1,428	1,463	1,479
2520	2,250	2,171	2,325	2,249
3360	2,959	2,944	3,015	2,973
4200	3,781	3,694	3,833	3,769

Таблица 9 – Параметры градуировочных зависимостей

№ градуировочной кривой	Квадрат коэффициента корреляции (R^2)	Точка пересечения с осью ординат	Наклон линии регрессии
1	0,99962	-0,01658	0,00090
2	0,99960	-0,00784	0,00088
3	0,99955	-0,01644	0,00091
Усредненная	0,99990	-0,01362	0,00090

Из данных таблицы 9 следует, что все градуировочные зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в плазме крови человека носят линейный характер. Квадрат коэффициента корреляции во всех случаях значительно превышает предельное значение 0,99. Следовательно, разработанная биоаналитическая методика обладает требуемой линейностью в диапазоне концентраций 30-4200 нг/мл для построения градуировочных кривых, предназначенных для количественного определения иматиниба в образцах плазмы крови человека.

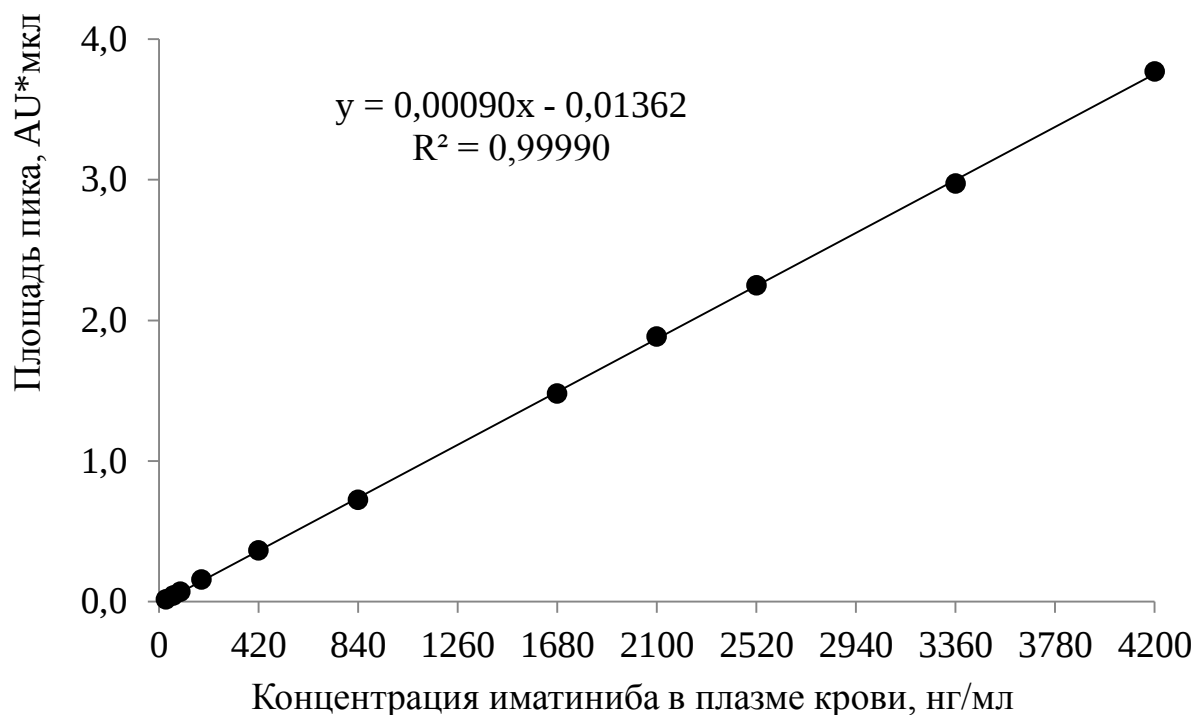


Рисунок 29 – Усредненный градуировочный график зависимости площади пика иматиниба от его концентрации в плазме крови человека

4.6 Оценка правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. Повторяемость отражает степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в условиях повторяемости – одним и тем же методом на идентичных объектах, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени. Внутрилабораторная прецизионность – это прецизионность в условиях, при которых результаты анализа получают по одной и той же методике, на идентичных пробах при вариации различных факторов: разное время анализа, разные операторы, разные партии реактивов и т.д.

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-найденно»). 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». Так, при валидации правильности проводили оценивание систематической погрешности, для начала рассчитывая Θ – разность общего среднего значения найденного количественного содержания и подобного значения образца, принятого за истинное, по формуле (2):

$$\Theta = X - C \quad (2)$$

Проверяли значимость найденной систематической погрешности по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывали $t_{\text{расч}}$ по формуле (3):

$$t_{\text{расч}} = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L'} + \frac{\Delta_0^2}{3}}} \quad (3)$$

где: $\frac{S_{Rл}^2}{L'}$ - дисперсия общего среднего результата;

Δ_0 – погрешность истинного значения концентрации иматиниба в образце.

Сравнивали полученное значение $t_{\text{расч}}$ с табличным значением ($t_{\text{табл}}$) при числе степеней свободы $f=L'-1$ для доверительной вероятности $P=0,95$.

Если рассчитанное значение было меньше табличного ($t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$), значит систематическую погрешность Θ считали незначимой на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимали равной нулю, а оценку систематической погрешности проводили по формуле (4):

$$\Delta_{в,с}^* = \Delta_{н,с}^* = |\Delta_c^*| = 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L'} + \frac{\Delta_0^2}{3}} = 1,96 \cdot \sigma_c^* \quad (4)$$

где σ_c^* – среднеквадратичное отклонение не исключенной систематической погрешности;

Если рассчитанное значение было больше табличного ($t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$), то оценку систематической погрешности считали значимой на фоне случайного разброса и учитывали ее при дальнейших расчетах:

$$\Delta_{с(в,н)}^* = \Theta \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L'} + \frac{\Delta_0^2}{3}} = \Theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^* \quad (5)$$

Далее вычисляли величину, которая и характеризует погрешность. Рассчитывали границы, в которых погрешность любого из совокупности результатов измерений, полученных при реализации методики, находится с принятой доверительной вероятностью $P=0,95$. Дисперсия погрешности

формируется за счет случайной и систематической погрешности. Характеристику погрешности рассчитывали по формуле (6):

$$\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = |\Delta^*| = \Theta + 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma_{\text{РЛ}}^*)^2 + (\sigma_{\text{с}}^*)^2} \quad (6)$$

Для расчета повторяемости также проводили несколько вычислений. Для начала определяли среднее арифметическое результатов единичного измерения для каждой серии по формуле (7):

$$X_l = \frac{\sum X_{1,N}}{N} \quad (7)$$

где N – число параллельных определений.

Затем рассчитывали выборочную дисперсию для каждой серии по формуле (8):

$$S_l^2 = \frac{\sum (X_{l,n} - X_l)^2}{N-1} \quad (9)$$

С помощью критерия Кохрена проверяли, можно ли пренебречь разбросом между сериями. Для всех дисперсий выбирали наибольшее значение S_{max}^2 , находили сумму всех дисперсий $\sum S_l^2$.

Находили расчетные значения критерия Кохрена по формуле (10):

$$G_{\text{расч}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{\sum S_l^2} \quad (10)$$

Сравнивали расчетное значение с табличным значением критерия Кохрена для числа степеней свободы $v=N-1$ и $f=1$ (1 - количество дисперсий, участвующих в расчетах) для $P=0,95$. Если расчетное значение было больше табличного ($G_{\text{расч}} > G_{\text{табл}}$) то соответствующее значение S_{max}^2 исключали из дальнейших расчетов и процедуру повторяли до следующего по значению S_{max}^2 и т.д. до тех пор, пока $G_{\text{расч}}$ не станет меньше или равно $G_{\text{табл}}$. Не исключенные из расчетов S_l^2 считали однородными и по ним оценивали средние квадратические отклонения (СКО), по которым можно установить одно значение показателя повторяемости для

результатов, полученных по методике в конкретной лаборатории на одном оборудовании, одним аналитиком, в течение короткого промежутка времени:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum S_l^2}{L'}} \quad (11)$$

где L' - количество серий, которое осталось после проверки серий на однородность.

Это значение СКО повторяемости – $\sigma^*_r = S_r$.

При оценке внутрилабораторной прецизионности также для начала рассчитывали общее среднее арифметическое значение по сериям по формуле (12):

$$X = \frac{\sum x_l}{L'} \quad (12)$$

а затем СКО в условиях промежуточной прецизионности по формуле (13):

$$S_{Rл} = \sqrt{\frac{\sum (x_{l,n} - X_l)^2}{L' - 1}} \quad (13)$$

$\sigma^*R = S_{Rл}$ есть значение показателя внутрилабораторной прецизионности результатов измерений полученных по разработанной биоаналитической методике.

Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 30 нг/мл для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 10, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 11, правильности – в таблице 12.

Таблица 10 – Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 30 нг/мл

Истинное значение концентрации иматиниба в плазме крови человека, нг/мл	Погрешность истинного раствора Δm , нг/мл	Результаты параллельных измерений (l=6)			Среднее значение результатов измерений, нг/мл
		1	2	3	
30	3,77	27,4	28,7	30,4	28,8
		31,2	26,5	27,2	28,3
		26,8	30,9	28,5	28,7
		29,4	27,4	26,2	27,7
		25,6	28,1	29,3	27,7
		27,3	26,6	30,3	28,1

Таблица 11 – Результаты расчета повторяемости для концентрации иматиниба в плазме крови человека, равной 30 нг/мл

Выборочная дисперсия результатов параллельных измерений, S_l^2	$S_{\max}^2$	$\sum S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
2,2633	6,4300	22,9767	0,2798	0,6161	1,9569
6,4300					
4,2433					
2,6133					
3,5633					
3,8633					

Таблица 12 – Результаты расчета правильности для концентрации иматиниба в плазме крови человека, равной 30 нг/мл

Θ	$t_{\text{расч}}$	$t_{\text{табл}}$	$\pm \Delta_c^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, %
1,4667	1,7488	2,2010	1,6438	5,6942	18,9808

Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 30 нг/мл и расчета внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 30 нг/мл и расчета внутрилабораторной прецизионности

Истинное значение концентрации иматиниба в плазме крови человека, нг/мл	Результаты параллельных измерений (l=6)			Среднее значение всех результатов измерений по 12 сериям, нг/мл	СКО внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{\text{РЛ}}^* = S_{\text{РЛ}}$
	1	2	3		
30	30,4	28,2	26,5	28,5	2,7815
	29,4	29,4	27,6		
	28,9	27	29,3		
	30,8	27,6	28,9		
	27,9	31,8	28,7		
	30,6	30,3	26,1		

Из данных таблиц 10-13 видно, что правильность методики на уровне концентрации, равном 30 нг/мл, составляет $100 \pm 18,98 \%$, что соответствует требованиям, т.к. для нижнего предела количественного определения правильность должна находиться в диапазоне $100 \pm 20 \%$. Стандартное квадратичное отклонение при определении повторяемости методики составляет $\pm 6,86 \%$, при определении внутрилабораторной прецизионности $\pm 9,75 \%$, что также соответствует предъявляемым требованиям ($\pm 15 \%$). Выборки результатов измерений в процессе определения метрологических параметров являются однородными.

Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 2100 нг/мл для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 14, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 15, правильности – в таблице 16.

Таблица 14 – Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 2100 нг/мл

Истинное значение концентрации иматиниба в плазме крови человека, нг/мл	Погрешность истинного раствора Δm , нг/мл	Результаты параллельных измерений ($l=6$)			Среднее значение результатов измерений, нг/мл
		1	2	3	
2100	263,71	2084,7	2187,5	2039,7	2104,0
		2113,2	2036,9	2104,3	2084,8
		2126,5	2143,8	2207,5	2159,3
		2134,2	2074,3	2109,6	2106,0
		2091,8	2058,1	2180,2	2110,0
		2148,1	2106,4	2112,7	2122,4

Таблица 15 – Результаты расчета повторяемости для уровня концентрации иматиниба в плазме крови человека, равного 2100 нг/мл

Выборочная дисперсия результатов параллельных измерений, S^2_l	$S^2_{\max}$	$\sum S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
5739,6133	3976,4433	14688,1633	0,2707	0,6161	49,4775
1740,6100					
1819,6633					
906,5433					
3976,4433					
505,2900					

Таблица 16 – Результаты расчета правильности для уровня концентрации иматиниба в плазме крови человека, равного 2100 нг/мл

Θ	$t_{\text{расч}}$	$t_{\text{табл}}$	$\pm \Delta_c^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, %
11,3361	0,3904	2,2010	56,9179	197,1671	9,3889

Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 2100 нг/мл и результаты расчета внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 2100 нг/мл и результаты расчета внутрилабораторной прецизионности

Истинное значение концентрации иматиниба в плазме крови человека, нг/мл	Результаты параллельных измерений (l=6)			Среднее значение всех результатов измерений по 12 сериям, нг/мл	СКО внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{\text{РЛ}}^* = S_{\text{РЛ}}$
	1	2	3		
2100	2051,8	2123,6	2161,7	2111,3	96,3127
	2146,9	2011,5	2033,1		
	2171,3	1987,6	2128,5		
	2086,7	2154,3	2204,4		
	2135,4	2016,8	2219,6		
	2108,3	2172,9	2034,2		

Из данных таблиц 14-17 видно, что правильность методики на уровне концентрации, равном 2100 нг/мл, составляет $100 \pm 9,39 \%$, что соответствует требованиям, т.к. правильность должна находиться в диапазоне $100 \pm 15 \%$. Стандартное квадратичное отклонение при определении повторяемости методики составляет $\pm 2,34 \%$, при определении внутрилабораторной прецизионности $\pm 4,56 \%$, что также соответствует предъявляемым требованиям ($\pm 15 \%$). Выборки результатов измерений в процессе определения метрологических параметров являются однородными.

Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 18, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 19, правильности – в таблице 20.

Таблица 18 – Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл

Истинное значение концентрации иматиниба в плазме крови человека, нг/мл	Погрешность истинного раствора Δm , нг/мл	Результаты параллельных измерений ($l=6$)			Среднее значение результатов измерений, нг/мл
		1	2	3	
4200	527,4	4175,3	4308,2	4259,1	4247,5
		4193,7	4262,3	4032,7	4162,9
		4284,9	4171,4	4219,6	4225,3
		4117,5	4235,1	4070,2	4140,9
		4169,5	4096,8	4256,3	4174,2
		4052,7	4214,3	4182,5	4149,8

Таблица 19 – Результаты расчета повторяемости для уровня концентрации иматиниба в плазме крови человека, равного 4200 нг/мл

Выборочная дисперсия результатов параллельных измерений, $S^2 l$	$S^2_{\max}$	$\sum S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
4515,9433	13890,5200	42566,8400	0,3263	0,6161	84,2287
13890,5200					
3244,9300					
7209,8433					
6376,6300					
7328,9733					

Таблица 20 – Результаты расчета правильности для уровня концентрации иматиниба в плазме крови человека, равного 4200 нг/мл

Θ	$t_{\text{расч}}$	$t_{\text{табл}}$	$\pm \Delta_c^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, нг/мл	$\pm \Delta^*$, %
8,9778	0,2244	2,2010	78,4070	271,6027	6,4667

Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл и результаты расчета внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты анализа модельных образцов плазмы крови человека, содержащих иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл и результаты расчета внутрилабораторной прецизионности

Истинное значение концентрации иматиниба в плазме крови человека, нг/мл	Результаты параллельных измерений (l=6)			Среднее значение всех результатов измерений по 12 сериям, нг/мл	СКО внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{\text{РЛ}}^* = S_{\text{РЛ}}$
	1	2	3		
4200	4254,3	4108,5	4181,6	4191,0	132,6730
	4321,8	4073,2	4261,7		
	4099,2	4241,5	4191,8		
	4207,3	4313,2	4261,2		
	4268,1	4291,8	4063,6		
	4215,4	4042	4178,5		

Из данных таблиц 18-21 видно, что правильность методики на уровне концентрации, равном 4200 нг/мл, составляет $100 \pm 6,47 \%$, что соответствует требованиям, т.к. правильность должна находиться в диапазоне $100 \pm 15 \%$. Стандартное квадратичное отклонение при определении повторяемости методики составляет $\pm 2,01 \%$, при определении внутрилабораторной прецизионности $\pm 3,17 \%$, что также соответствует предъявляемым требованиям ($\pm 15 \%$). Выборки результатов измерений в процессе определения метрологических параметров являются однородными.

Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для уровней концентрации иматиниба в плазме крови человека, равных 30, 2100 и 4200 нг/мл представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для уровней концентрации иматиниба в плазме крови человека, равных 30, 2100 и 4200 нг/мл

Уровень концентрации иматиниба в плазме крови, нг/мл	σ_T^* , нг/мл	σ_T^* , %	σ_{RL}^* , нг/мл	σ_{RL}^* , %	$\pm \Delta^*c$, нг/мл	$\pm \Delta^*c$, %	$\pm \Delta^*$, 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

В результате проведенных экспериментов доказано, что разработанная биоаналитическая методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ обладает требуемой правильностью, повторяемостью и внутрिलाбораторной прецизионностью.

4.7 Исследование стабильности анализируемых образцов

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

Исследовали стабильность образцов, содержащих иматиниб, после процедуры пробоподготовки в растворенном виде и в виде сухих остатков при хранении в комнатных условиях (22-24 °C), в холодильнике (3-6 °C) и при заморозке в морозильной камере (-18-22 °C). Модельные образцы плазмы крови человека, содержащие иматиниб, были подвергнуты многократному (3 цикла) размораживанию и замораживанию, а затем процедурам пробоподготовки и анализа. Также аналогичные биообразцы хранились в размороженном виде при комнатной температуре (22-24 °C) и в холодильнике (+3-6 °C), после чего проходили пробоподготовку и анализировались. Исследуемые образцы анализировали каждые 8 ч в течение суток. Свежеприготовленные образцы из той же серии анализировали сразу после приготовления.

Найденное содержание иматиниба в исследуемых образцах проводили по градуировочному графику. В каждом эксперименте исследовали по 3 образца, определяя среднее значение найденных концентраций.

Результаты исследования стабильности модельных образцов (n=3) приведены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты исследования стабильности модельных образцов плазмы крови и образцов аналита после пробоподготовки

Образец	Условия хранения	Среднее значение найденных концентраций, нг/мл (n=3)			
		0 ч	8 ч	16 ч	24 ч
Номинальная концентрация 30 нг/мл					
Свежеприготовленный		28,4	—	—	—
В растворенном виде	Комнатная температура (22-24 °С)	—	27,7	25,3	24,1
	В холодильнике (+3-6 °С)	—	26,8	26,6	24,8
	В морозильной камере (-18-22 °С)	—	28,0	27,9	28,6
В виде сухого остатка	Комнатная температура (22-24 °С)	—	27,4	27,8	27,2
	В холодильнике (+3-6 °С)	—	26,8	28,1	27,5
	В морозильной камере (-18-22 °С)	—	27,7	27,3	28,0
Плазма крови	Многократное размораживание и замораживание (3 цикла)	—	27,1	29,3	28,2
Плазма крови в размороженном виде	Комнатная температура (22-24 °С)	—	28,5	23,9	24,6
	В холодильнике (+3-6 °С)	—	27,6	28,2	27,3
Номинальная концентрация 4200 нг/мл					
Свежеприготовленный		4256,2	—	—	—
В растворенном виде	Комнатная температура (22-24 °С)	—	4031,7	3791,6	3651,4
	В холодильнике (+3-6 °С)	—	4272,2	4309,7	3707,8
	В морозильной камере (-18-22 °С)	—	4167,4	4139,2	4195,0

Окончание таблицы 23

В виде сухого остатка	Комнатная температура (22-24 °C)	–	4208,5	4287,3	3998,6
	В холодильнике (+3-6 °C)	–	4307,8	4065,9	4119,2
	В морозильной камере (-18-22 °C)	–	3963,4	4027,1	4148,5
Плазма крови	Многократное размораживание и замораживание (3 цикла)	–	4362,7	4182,1	4247,8
Плазма крови в размороженном виде	Комнатная температура (22-24 °C)	–	4174,5	3802,6	3684,9
	В холодильнике (+3-6 °C)	–	4264,2	4305,7	3958,3

Из данных таблицы 23 следует, что образцы анализата после процедуры пробоподготовки в растворенном виде не следует хранить при комнатной температуре (22-24 °C) более 8 ч, в холодильнике (+3-6 °C) 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 °C) более 8 ч приводит к деградации анализата. Исследование стабильности показало идентичные результаты для обоих уровней концентрации иматиниба в плазме крови человека. В результате проведенных экспериментов изучена стабильность анализата в биологической матрице, в виде сухого остатка после пробоподготовки и в виде раствора, предназначенного для хроматографического анализа при различных условиях хранения.

4.8 Оценка переноса сигнала определяемого вещества

Перенос во время валидации необходимо оценить, вводя холостые образцы после образцов с высокой концентрацией или градуировочных образцов верхнего предела градуировочного графика. Перенос вещества, а, следовательно, и аналитического сигнала в холостой образец после образца с высокой концентрацией не должен превышать 20 % величины нижнего предела

количественного определения. Если очевидно, что перенос неизбежен, то для того чтобы перенос не повлиял на правильность и прецизионность анализа необходимо предусмотреть, протестировать во время валидации и принять во время анализа исследуемых образцов специальные меры. Например, после образцов с ожидаемо высокой концентрацией аналита и до начала анализа очередного исследуемого образца вводить холостые образцы, либо специально подобранным соотношением элюентов, гарантирующим вымывание аналита, промывать колонку после анализа образцов с высокой концентрацией вещества [104].

Перенос сигнала определяемого вещества в следующий анализ после анализа образца с высокой концентрацией аналита может негативно сказываться на показателях правильности и прецизионности результатов измерений. Это явление чаще всего может наблюдаться при изократическом элюировании. Градиентное элюирование, как правило, предполагает в конце анализа большую долю растворителя с высокой элюирующей силой, который способствует полному смыванию аналита с хроматографической колонки.

Для подтверждения отсутствия эффекта переноса анализировали холостой образец плазмы крови человека после анализа модельного образца плазмы с концентрацией иматиниба, равной 4200 нг/мл и соответствующей верхнему пределу линейного диапазона методики.

Хроматограмма модельного образца плазмы крови, содержащего иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл представлена на рисунке 30, хроматограмма холостого образца плазмы крови – на рисунке 31.

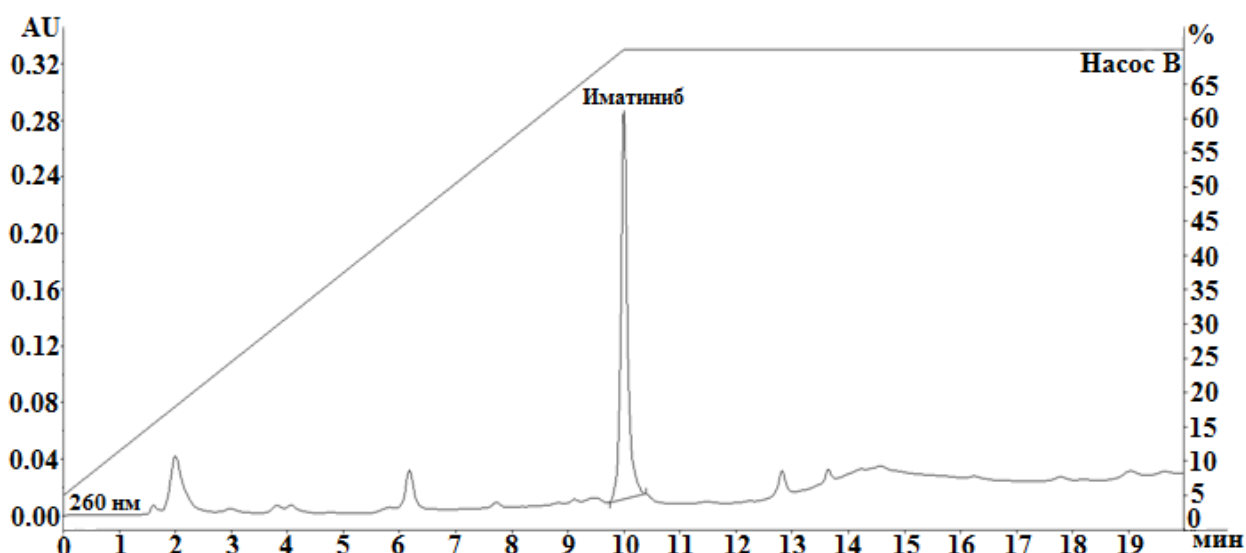


Рисунок 30 – Хроматограмма иматиниба в плазме крови человека с концентрацией 4200 нг/мл

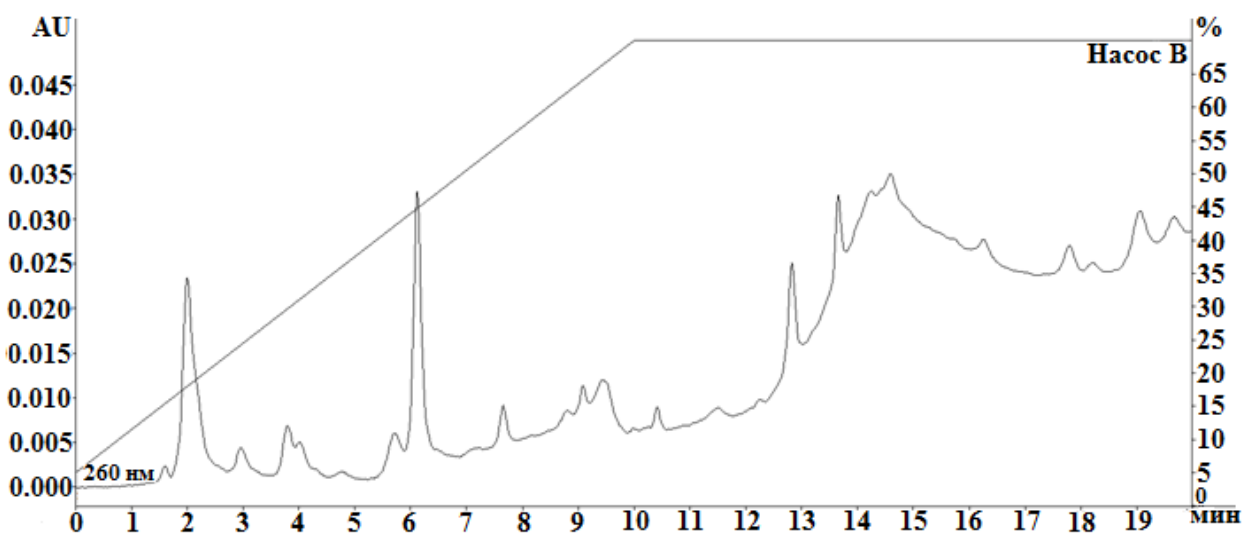


Рисунок 31 – Хроматограмма холостого образца плазмы крови человека

На хроматограмме холостого образца плазмы крови показано отсутствие пика иматиниба после анализа образца плазмы крови с высокой концентрацией аналита. Таким образом, нами доказано отсутствие переноса сигнала определяемого вещества.

4.9 Изучение надежности (устойчивости, робастности) методики

Несмотря на то, что надежность биоаналитической методики традиционно упоминается реже остальных параметров, она является одной из важнейших валидируемых характеристик. Надежность биоаналитической методики является

показателем способности методики, не подвергаться влиянию незначительных, но контролируемых изменений в характеристиках метода, а также надежности методики в нормальных условиях ее применения. По сути, исследование надежности является оценкой возможности эффективного использования метода в стандартных лабораторных условиях, а также при их допустимых изменениях. Оценка надежности учитывается на этапе разработки, а также зависит от типа исследуемой методики. Такая оценка должна демонстрировать надежность анализа под влиянием контролируемых изменений в параметрах метода. Если результаты измерений подвержены воздействию изменений условий применения методики, необходимо обеспечить надлежащий контроль таких условий, либо включить в описание методики соответствующее предупреждение. Решение о том, какие именно изменения могут считаться незначительными, но контролируемыми, зависит от типа методики и принимается самим аналитиком.

Так, в процессе исследования надежности методики устанавливали влияние на параметры хроматографического пика иматиниба следующих изменяемых факторов:

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

Исследование надежности проводили с помощью модельного образца плазмы крови человека, содержащего иматиниб с концентрацией 4200 нг/мл. Результаты оценки влияния данных факторов на параметры хроматографического пика иматиниба представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Результаты оценки влияния изменяемых хроматографических параметров методики на характеристики пика иматиниба

Изменяемое условие анализа	Параметры хроматографического пика иматиниба				
	Время удерживания, мин	Ширина пика, мкл	Фактор асимметрии пика	Разрешение	Эффективность разделения, ТТ
В соответствии с методикой	10,05	12,2	1,28	2,44	43561
Скорость потока 0,09 мл/мин	10,39	13,3	1,42	2,27	44090
Скорость потока 0,11 мл/мин	9,76	11,8	1,34	2,13	38947
Колонка другой серии	10,03	11,5	1,31	2,57	42469
pH элюентов 3,4	10,09	13,8	1,44	1,85	33674
pH элюентов 3,5	10,21	18,2	1,49	1,73	28562
pH элюентов 3,2	9,91	11,5	1,29	2,37	39150
pH элюентов 3,1	9,84	12,6	1,37	2,25	37319
Реактивы других производителей	10,04	11,9	1,33	2,47	44811
Температура колонки 40 °С	9,89	12,1	1,41	2,24	38256
Температура колонки 30 °С	10,17	16,5	1,47	2,06	31463
Градиент с 5 до 70 % фазы Б за 8 мин	7,53	17,2	1,56	1,84	26451
Критическое значение	10,03 ± 0,1	–	Не более 1,5	Не менее 2	Не менее 30000

Из данных таблицы 24 следует, что использование другой хроматографической колонки не приводит к критическим изменениям параметров хроматографического пика иматиниба в модельном образце плазмы крови человека. Изменение скорости потока элюентов ведет к критическому изменению времени удерживания, увеличению фактора асимметрии, уменьшению разрешения между пиком иматиниба и ближайшим посторонним пиком биологической матрицы, при этом ширина пика и эффективность разделения меняются незначительно.

В случае иматиниба, являющегося ионогенным основанием, важнейшую роль в методике его определения играет значение pH элюентов, что уже было

доказано в процессе разработки методики. Повышение значения pH подвижной фазы приводит к критическому увеличению времени удерживания иматиниба, а также снижению разрешения и падению эффективности разделения, росту фактора асимметрии. Понижение pH способствует критическому уменьшению времени удерживания, незначительному снижению эффективности разделения, при этом разрешение, ширина пика и фактор асимметрии изменяются в небольшом диапазоне. Следовательно, при приготовлении подвижной фазы следует особое внимание уделять требуемому значению pH среды, которое должно составлять 3,3. При использовании pH-метра необходимо проводить измерение с точностью 0,05 и выше.

Применение реактивов других производителей для приготовления подвижной фазы критически не изменяет параметры пика иматиниба, однако в процессе проведения измерений следует обращать внимание на квалификацию используемых реактивов, она должна быть не ниже той, что приведена в разработанной методике.

Изменение температуры хроматографической колонки, в которой происходит разделение, оказывает прямое влияние на вязкость растворителей, элюирующих определяемое соединение, этот факт не может не отражаться на изменении времени удерживания. Так, при повышении температуры колонки до 40 °С, время удерживания критически уменьшается, хотя при этом происходит незначительное увеличение фактора асимметрии и уменьшение разрешения и эффективности разделения. При понижении температуры до 30 °С, время удерживания критически возрастает, увеличивается ширина пика и фактор асимметрии, что может быть связано с некоторым увеличением размывания хроматографической зоны аналита за счет снижения вязкости растворителей.

Изменение состава подвижной фазы путем перепрограммирования условий градиента кардинальным образом меняет все параметры пика иматиниба – критически уменьшаются время удерживания, разрешение и эффективность разделения, возрастают фактор асимметрии и ширина пика. Это вполне

объяснимо, т.к. при смене состава элюентов происходит значительное изменение всей хроматографической системы.

В процессе валидации надежности методики выявлено отсутствие влияния хроматографической колонки и реактивов для приготовления подвижной фазы на параметры хроматографического пика иматиниба в плазме крови человека. Критическими условиями являются рН элюентов и их состав, скорость потока, температура колонки. За соблюдением данных условий анализа требуется особый контроль.

В результате проведенных валидационных исследований доказаны специфичность, линейность, правильность, прецизионность и надежность разработанной биоаналитической методики, установлены предел обнаружения и нижний предел количественного определения иматиниба в плазме крови человека. Определена стабильность аналита в растворе и биологической матрице при различных условиях хранения, доказано отсутствие переноса сигнала аналита в холостой образец после анализа образца с высоким содержанием целевого компонента.

Разработанная и валидированная методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ внедрена в практику работы Лаборатории аналитической химии Отдела фармацевтических разработок ООО «Ифар» (г. Томск, Россия). Акт внедрения методики представлен в Приложении 2.

ГЛАВА 5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИМАТИНИБА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Согласно протоколу клинического исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов на основе иматиниба, расчет фармакокинетических параметров и их статистическая обработка были выполнены на фармакокинетических данных, полученных от 24 добровольцев, полностью завершивших данное клиническое исследование по Протоколу.

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

Результаты определения количественного содержания иматиниба в плазме крови добровольцев после приема тестируемого препарата представлены в таблице 25, после приема референтного препарата в таблице 26.

Фармакокинетические профили зависимости концентрации иматиниба в плазме крови у 24 субъектов от времени забора крови, на фоне однократного приема исследуемого препарата (ИМВ, капсулы 100 мг, Россия) и препарата сравнения (Гливек[®], капсулы 100 мг, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) приведены в виде графиков для средних значений на рисунке 32.

Таблица 25 – Количественное содержание (нг/мл) иматиниба в плазме крови добровольцев после приема тестируемого препарата (ИМВ, капсулы 100 мг, Россия)

№ добровольца	Время забора крови, ч													
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12	24	48	72
1	0	489,5	1608,9	2756,7	3134,3	2543,3	2189,5	2073,1	1989,5	1402,1	1195,5	685,1	183,6	71,6
2	0	1467,9	2929,1	3638,9	3983,7	3568,5	3077,1	2671,9	2227,9	2088,6	1923,3	1071,3	446,3	232,2
3	0	73,3	1980,5	2599,1	3590,5	3611,9	3749,1	3267,6	2843,3	2610,5	2419,1	1030,5	454,8	0
4	0	0	747,1	2078,4	3492,5	4484,6	3533,1	2744,0	2423,7	1939,3	1801,8	886,2	353,4	81,5
5	0	85,7	1912,1	3903,7	4538,1	3127,4	3932,1	3232,6	2751,8	2187,5	1887,0	887,0	165,8	100,7
6	0	172,1	1391,3	1975,9	2251,6	2113,1	1788,8	1570,8	1332,3	1183,6	861,8	449,0	169,5	95,5
7	0	401,7	1029,3	1481,9	2050,4	2250,4	2001,7	1668,8	1299,0	1096,4	818,8	435,9	164,8	67,5
8	0	402,8	1099,8	1580,6	1594,8	2452,5	1966,1	1721,4	1700,1	1451,1	1327,4	754,1	350,1	217,8
9	0	101,4	646,6	1203,8	1510,9	1534,7	1495,4	1314,5	1276,4	914,5	851,4	420,4	149,0	75,2
10	0	228,9	1230,2	1427,6	2082,1	1965,2	1948,4	1800,3	1779,5	1248,4	1266,3	695,1	136,7	31,5
11	0	0	434,7	1137,9	1387,9	1885,7	1821,6	1709,7	1359,7	1157,5	955,3	537,9	154,2	54,2
12	0	465,2	1796,7	2077,8	2648,3	2833,6	2165,2	1747,3	1677,8	1414,6	1132,5	757,8	342,0	96,7
13	0	332,2	855,6	1450,3	1549,2	1732,2	1558,8	1466,3	1139,7	995,0	899,2	332,2	75,8	< НПКО
14	0	190,0	1312,6	2191,1	2977,1	3183,5	2993,2	2208,3	2105,1	1651,3	1407,2	611,5	162,0	76,0
15	0	87,2	1545,1	2150,4	2637,6	3282,0	2943,0	2062,0	1643,0	1397,8	1063,0	535,7	124,1	65,1
16	0	77,9	542,4	1253,9	1893,5	2118,5	2211,2	2240,4	1849,7	1477,9	1188,3	573,7	200,8	79,9
17	0	87,7	165,5	563,4	1623,4	2281,3	2658,2	2023,4	1707,7	1402,4	1274,0	570,8	262,4	101,3
18	0	316,0	2031,8	2792,9	3008,7	3497,1	2860,2	2147,6	2111,8	1480,2	1239,2	540,2	140,2	73,9
19	0	190,0	200,1	525,4	886,0	1701,1	2309,2	2244,5	2043,5	1888,0	1363,7	902,1	286,0	149,6
20	0	0	597,6	1332,0	2100,7	2247,1	2367,3	2006,7	1734,0	1294,6	1133,0	575,4	181,5	100,7
21	0	165,1	785,1	1430,1	1944,1	2205,1	2108,1	1576,1	1534,1	1359,1	1117,1	579,1	214,1	130,1
22	0	831,2	2580,7	2642,3	3035,2	2539,2	2399,8	1948,3	1807,9	1359,4	1241,3	552,4	165,5	117,0
23	0	194,7	2122,7	3240,7	3726,7	4035,7	4087,7	3349,7	2995,7	2380,7	1933,7	819,7	234,7	111,7
24	0	1416,3	2479,4	2681,4	2816,3	2531,9	2267,8	2140,6	1825,1	1307,6	1121,2	646,4	194,0	121,2

Таблица 26 – Количественное содержание (нг/мл) иматиниба в плазме крови добровольцев после приема референтного препарата (Гливек[®], капсулы 100 мг, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария)

№ добровольца	Время забора крови, ч													
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12	24	48	72
1	0	289,5	1316,4	2228,3	2389,5	2355,2	2153,7	1922,4	1749,2	1307,4	826,9	686,6	174,6	73,1
2	0	975,1	2939,1	3470,8	3878,8	3588,6	3469,3	2670,5	2702,1	2156,1	1939,1	1150,4	521,0	312,7
3	0	0	983,3	2229,0	2317,6	2549,0	2484,8	2060,5	1990,5	1624,8	1516,2	861,9	104,8	0
4	0	319,0	1951,8	3415,9	4330,0	4186,2	3762,8	2723,7	2469,0	2136,2	1590,9	920,6	233,1	45,6
5	0	276,0	2204,2	3902,0	3521,4	3831,9	2493,0	3023,9	2633,3	2230,9	2115,7	873,7	112,4	117,4
6	0	1815,7	3295,2	2902,9	3313,1	2832,3	2673,4	1981,1	2168,2	1224,7	1106,7	509,3	149,0	91,3
7	0	105,6	878,0	1799,0	2384,6	2393,8	2245,1	1771,4	1878,0	1125,4	870,1	434,6	138,5	70,1
8	0	0	845,1	1432,6	2216,4	2215,0	2240,6	1866,5	1564,9	1466,8	1169,5	784,0	353,0	296,1
9	0	114,5	578,8	1471,6	1772,8	1902,6	1570,4	1379,9	1416,8	1069,2	824,0	421,6	149,0	84,7
10	0	< НПКО	1183,4	1557,4	1770,4	1838,0	2026,3	1767,8	1761,3	1393,8	1170,4	635,4	210,7	< НПКО
11	0	91,2	684,7	1245,5	1559,7	2056,4	1676,0	1596,6	1229,2	1201,0	1043,3	620,5	151,0	69,4
12	0	938,9	2316,7	2935,7	3356,7	3188,3	2556,7	2193,6	1933,6	1743,1	1567,3	896,7	386,2	135,7
13	0	49,2	870,5	1146,1	1484,4	1222,6	1286,5	902,4	855,6	623,7	563,1	305,6	73,7	< НПКО
14	0	211,5	1157,7	1649,1	2184,6	3174,9	2911,5	2521,2	2129,8	1853,4	1784,6	826,6	231,9	83,5
15	0	585,1	1655,7	2099,9	2306,2	2437,8	1926,2	1720,9	1390,4	1250,4	1263,0	442,0	129,9	77,8
16	0	0	1018,5	1685,2	2116,4	2695,6	2284,1	2272,7	1739,3	1234,1	1335,2	590,4	254,9	104,9
17	0	0	119,2	772,9	1949,8	2957,1	2282,4	1911,9	1485,5	1499,2	1160,3	687,7	200,3	103,4
18	0	1107,6	2520,2	2690,8	3030,8	3612,9	3041,3	2360,2	1962,3	1646,6	1449,7	566,6	127,6	71,8
19	0	631,4	1386,0	1663,8	1786,0	1837,5	1861,7	1533,4	1194,0	1057,7	998,1	582,9	218,3	130,4
20	0	264,3	919,9	1947,1	2085,5	3009,8	2453,2	1759,3	1522,9	1209,8	1111,8	568,4	177,4	98,7
21	0	152,1	598,1	1274,1	1655,1	1939,1	1855,1	1750,1	1429,1	1260,1	985,1	512,1	192,1	119,1
22	0	460,5	2020,1	2680,7	2639,2	2370,6	1939,2	1924,1	1751,4	1249,3	1141,3	568,5	207,9	127,1
23	0	591,7	1724,7	2635,7	3001,7	2723,7	2958,7	2300,7	1947,7	1483,7	1382,7	537,7	176,7	104,7
24	0	1851,3	3741,6	3711,5	3538,7	3446,4	2397,9	2265,8	1510,5	1404,7	1196,9	488,2	188,2	127,0

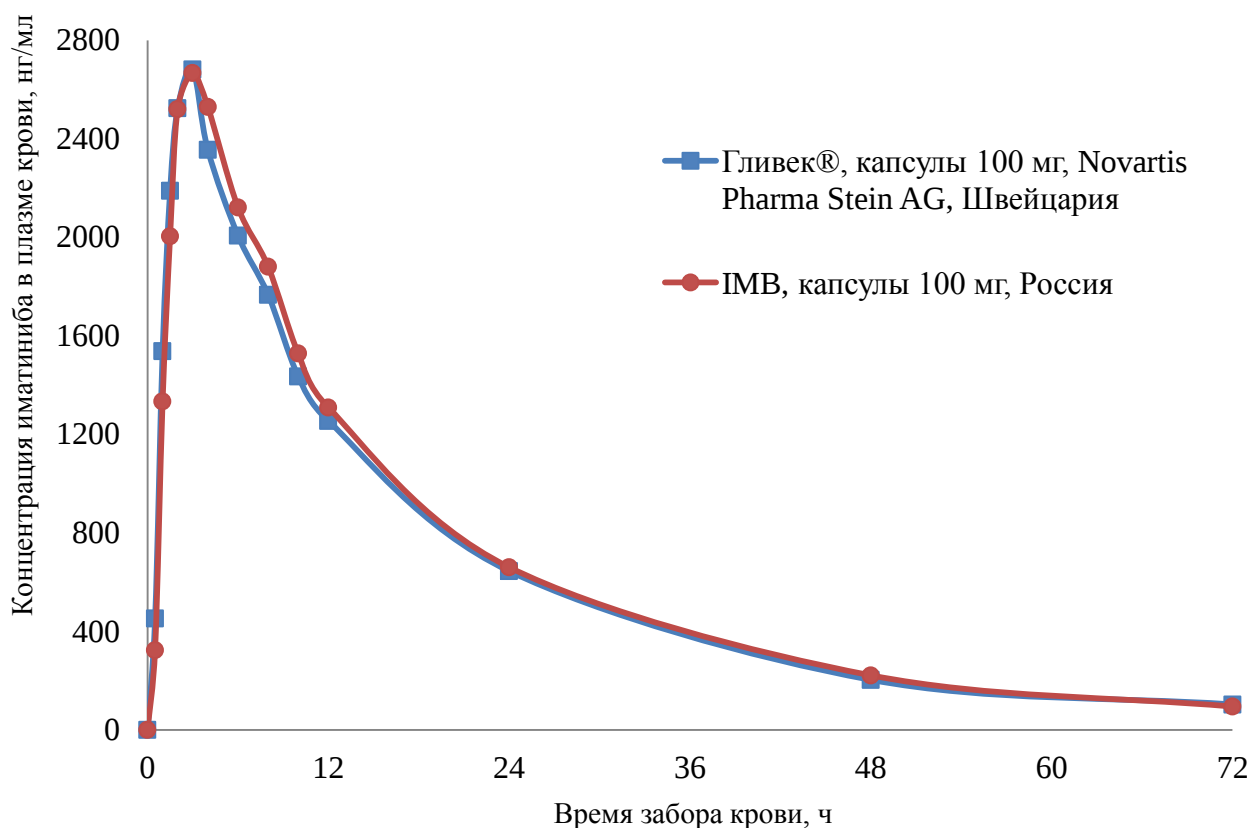


Рисунок 32 – Усредненные зависимости концентрации иматиниба (нг/мл) в плазме крови добровольцев от времени забора крови после однократного приема 4 капсул исследуемого препарата ИМВ, капсулы 100 мг (Россия) и 4 капсул препарата Гливек[®], капсулы 100 мг, (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) в линейных координатах

Из представленного рисунка видно, что концентрации иматиниба в плазме крови после приема сравниваемых препаратов близки, усредненные фармакокинетические профили иматиниба после однократного приема 4 капсул препаратов ИМВ, капсулы 100 мг (Россия) и Гливек[®], капсулы 100 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) практически совпадают.

Результаты расчета фармакокинетических параметров и обобщающие результаты статистического анализа каждого из фармакокинетических параметров представлены в таблицах 27-28.

Таблица 27 – Фармакокинетические параметры иматиниба и результаты их статистического анализа после приема исследуемого препарата IMB

Параметр	$C_{\max}$, мкг/мл	$T_{\max}$, ч	AUC_{0-72}	$AUC_{0-\infty}$	K_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, ч	AUMC	MRT, ч	$AUC_{0-72}/$ $AUC_{0-\infty}$, %	$C_{\max}/$ AUC_{0-72}
Среднее арифметическое	2,87	3,04	48,75	51,18	0,05	15,9	1089,6	22,3	95,32	0,06
Среднее геометрическое	2,75	2,91	47,10	49,43	0,04	13,9	1025,6	21,8	95,28	0,06
Стандартное отклонение	0,87	0,95	13,40	14,03	0,06	5,54	409,18	5,35	3,06	0,01
Коэффициент вариации, %	30,4	31,4	27,49	27,42	104,4	34,9	37,55	24,0	3,21	15,12
Медиана	2,74	3,0	46,21	48,20	0,04	16,4	963,81	21,0	96,01	0,06
Минимальное	1,53	2,0	28,11	28,49	0,03	1,21	433,19	15,4	86,03	0,04
Максимальное	4,54	6,0	78,10	82,69	0,31	26,8	2240,4	39,8	100,0	0,08
Первый квартиль	2,25	2,0	42,17	43,86	0,04	14,5	824,0	18,3	93,49	0,05
Третий квартиль	3,34	3,25	52,10	57,86	0,05	18,7	1242,9	24,9	96,95	0,07
Размах	3,0	4,0	49,99	54,20	0,28	25,5	1807,2	24,4	13,97	0,03

Таблица 28 – Фармакокинетические параметры иматиниба и результаты их статистического анализа после приема препарата Гливек®

Параметр	$C_{\max}$, мкг/мл	$T_{\max}$, ч	AUC_{0-72}	$AUC_{0-\infty}$	K_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, ч	AUMC	MRT, ч	$AUC_{0-72}/$ $AUC_{0-\infty}$, %	$C_{\max}/$ AUC_{0-72}
Среднее арифметическое	2,79	2,63	47,12	50,29	0,04	18,1	1150,2	23,9	94,17	0,06
Среднее геометрическое	2,69	2,49	45,60	48,49	0,04	17,3	1045,8	22,9	94,06	0,06
Стандартное отклонение	0,76	0,81	12,29	14,06	0,01	5,59	604,64	8,50	4,50	0,01
Коэффициент вариации, %	27,2	30,9	26,08	27,96	34,06	30,9	52,57	35,5	4,78	15,67
Медиана	2,69	3,0	45,15	48,36	0,04	17,9	1061,2	21,8	94,73	0,06
Минимальное	1,48	1,0	21,53	21,92	0,02	8,82	370,05	14,9	78,26	0,04
Максимальное	4,33	4,0	80,99	92,53	0,08	34,2	2969,8	56,6	100,0	0,08
Первый квартиль	2,19	2,0	39,51	42,21	0,03	14,8	833,93	19,6	92,50	0,05
Третий квартиль	3,32	3,0	50,49	54,17	0,05	20,4	1214,4	25,8	96,74	0,07
Размах	2,85	3,0	59,46	70,60	0,06	25,3	2599,8	41,7	21,74	0,04

90% доверительные интервалы для отношений средних значений параметров $C_{\max}$, AUC_{0-t} , и $C_{\max} / AUC_{0-t}$ иматиниба, а также индивидуальная вариабельность и мощность представлены в таблице 29.

Таблица 29 – 90 % доверительные интервалы для отношения средних значений параметров $C_{\max}$, AUC_{0-t} и $C_{\max}/AUC_{0-t}$ иматиниба

Параметр	Отношение средних значений, %	90 % доверительные интервалы		Пределы доверительных интервалов, %	CV	Мощность, %
		Нижняя граница	Верхняя граница			
$C_{\max}$	102,93	95,44	109,44	75-133	13,87	100
AUC_{0-t}	103,46	98,03	108,81	80-125	10,55	100
$C_{\max}/AUC_{0-t}$	98,87	94,60	103,52	75-133	9,11	100

Исходя из того, что процентное соотношение значений AUC_{0-t} иматиниба в двух лекарственных формах (исследуемая/сравнительная) составляет 97-103 %, а коэффициент вариации равен 10,55 %, то мощность теста достигает 100 % с доверительным интервалом 80-125 % иматиниба при уровне значимости 5 %. Данный факт позволяет доказать биоэквивалентность препаратов ИМВ, капсулы 100 мг (Россия) и Гливек®, капсулы 100 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария).

В результате, проведено количественное определение иматиниба в образцах плазмы крови добровольцев методом ВЭЖХ с УФ-детектированием согласно разработанной и валидированной биоаналитической методике после приема тестируемого препарата ИМВ, капсулы 100 мг (Россия) и референтного препарата Гливек®, капсулы 100 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария), рассчитаны фармакокинетические параметры и проведен их статистический анализ.

ВЫВОДЫ

Разработана новая биоаналитическая методика количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием и проведен анализ образцов плазмы крови добровольцев в клиническом исследовании биоэквивалентности препаратов, содержащих иматиниб.

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.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

$AUC_{0-\infty}$	– площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества – время» в интервале от 0 до ∞
AUC_{0-t}	– площадь под кривой “концентрация лекарственного вещества – время” в интервале от 0 до момента t отбора последнего образца крови, вычисленная линейным методом трапеций
AUMC	– площадь под кривой момента
C_{max}	– максимальное измеренное значение концентрации препарата в плазме крови человека
CV	– коэффициент вариации
k_{el}	– константа элиминации вещества из плазмы крови человека
MRT	– среднее время удержания препарата в крови
$T_{1/2}$	– период полувыведения лекарственного средства
T_{max}	– время до достижения максимальной измеренной концентрации в плазме крови человека
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ВЭЖХ-УФ	– высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-спектрофотометрическим детектированием
ЖЖЭ	– жидкостно-жидкостная экстракция
ЛП	– лекарственный препарат
НПКО	– нижний предел количественного определения
СКО	– среднее квадратическое отклонение
ТЭА	– триэтиламин
УФ-спектр	– ультрафиолетовый спектр
ХМЛ	– хронический миелоидный лейкоз

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deininger, M. W. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib / M. W. Deininger, B. J. Druker // *Pharmacological Reviews*. – 2003. – Vol. 55, № 3. – P. 401-423.
2. Vigneri, P. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase / P. Vigneri, J. Y. Wang // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol. 7, № 2. – P. 228–234.
3. Peng, B. Absolute bioavailability of Imatinib (Glivec®) orally versus intravenous infusion / B. Peng, C. Dutreix, G. Mehring // *Journal of Clinical Pharmacology*. – 2004. – Vol. 44, № 2. – P. 158–162.
4. Peng, B. Clinical pharmacokinetics of imatinib / B. Peng, P. Lloyd, H. Schran // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2005. – Vol. 44, № 9. – P. 879–894.
5. Hensley, M. L. Imatinib treatment: specific issues related to safety, fertility, and pregnancy / M. L. Hensley, J. M. Ford // *Seminars in Hematology*. – 2003. – Vol. 40, № 2. – P. 21–25.
6. Шохин, И. Е. Определение иматиниба в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором / И. Е. Шохин, Г. В. Раменская, Ю. В. Медведев, Т. А. Ярушок, Л. Л. Шамаль // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2013. – № 2. – С. 220-228.
7. Медведев, Ю. В. Разработка и валидация методики определения противоопухолевого препарата иматиниба в плазме крови / Ю. В. Медведев, И. Е. Шохин, А. Ю. Савченко, Т. А. Ярушок // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2013. – № 1 (2). – С. 74-77.
8. Об обращении лекарственных средств: [Федеральный закон № 61-ФЗ: принят Советом Федерации Гос. Думы 24 марта 2010 г.]. – М.: Кремль, 2010. – 83 с.
9. Din, O. S. Treatment of gastrointestinal stromal tumor: focus on imatinib mesylate / O. S. Din, P. J. Woll // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. – 2008. Vol.4, № 1. – P. 149-162.

10. Druker, B. J. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia / B. J. Druker, M. Talpaz, D. J. Resta // *The New England journal of medicine*. – 2001. – Vol. 344, № 14. – P. 1031-1037.
11. Druker, B. J. / Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells / B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, N. B. Lydon // *Nature medicine*. – 1996. – Vol. 2, № 5. – P. 561-566.
12. Gambacorti-Passerini, C. Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib / C. Gambacorti-Passerini, L. Antolini, F. X. Mahon // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2011. – Vol. 103, № 7. – P. 553-561.
13. Hunter T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib / T. Hunter // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. Vol. 117. – P. 2036-2043.
14. Lugo, T. G. Tyrosine kinase activity and transformation potency of BCR-ABL oncogene products / T. G. Lugo, A. M. Pendergast, A. J. Muller, O. N. Witte // *Science*. – 1990. – Vol. 247, № 4946. – P. 1079-1082.
15. Monmaney, T. A triumph in the war against cancer: oncologist Brian Druker developed a new treatment for a deadly cancer, leading to a breakthrough that has transformed medicine / T. Monmaney // *Smithsonian*. – May, 2011.
16. Morris, C. M. Ph-negative chronic myeloid leukemia: molecular analysis of ABL insertion into M-BCR on chromosome 22 / C. M. Morris, N. Heisterkamp, M. A. Kennedy, P. H. Fitzgerald, J. Groffen // *Blood*. – 1990. – Vol. 76, № 9. – P. 1812-1818.
17. Pray, L. A. Gleevec: the breakthrough in cancer treatment / L. A. Pray // *Nature Education*. – 2008. – P. 1(1), № 37.
18. Rowley, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining / J. D. Rowley // *Nature*. – 1973. – Vol. 243. – P. 290-293.

19. Rowley, J. D. Chromosome abnormalities in leukemia / J. D. Rowley // *Journal of clinical oncology*. – 1988. – Vol. 6, № 2. – P. 194-202.
20. Rowley, J. D. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation / J. D. Rowley // *Journal of clinical oncology*. – 1988. – Vol. 6, № 5. – P. 919-925.
21. Rowley, J. D. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia / J. D. Rowley // *Annales de génétique*. – 1973. – Vol. 16, № 2. – P. 109-112.
22. Saponara, M. Alternative schedules or integration strategies to maximise treatment duration with sunitinib in patients with gastrointestinal stromal tumours / M. Saponara, C. Lolli, M. Nannini, V. Di Scioscio, C. Serra, A. Mandrioli, M. C. Pallotti, G. Biasco, M. A. Pantaleo // *Oncology letters*. – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 1793-1799.
23. Gazit, A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors / A. Gazit, P. Yaish, C. Gilon, A. Levitzki // *Journal of medicinal chemistry*. – 1989. – Vol. 32. – P. 2344-2352.
24. Anafi, M. Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate / M. Anafi // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. – P. 3524-3529.
25. Zimmermann, J. Phenylamino-pyrimidine (PAP)-derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation Inhibitors / J. Zimmermann, E. Buchdunger, H. Mett // *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. – 1996. – Vol. 6. – P. 1221-1226.
26. Zimmermann, J. Potent and selective inhibitors of the Abl kinase - Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives / J. Zimmermann, E. Buchdunger, H. Mett, T. Meyer, N. B. Lydon // *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. – 1997. – Vol. 7. – P. 187-192.
27. Cowan-Jacob, S. W. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment / S. W. Cowan-Jacob, V. Guez, G. Fendrich // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2004. – Vol. 4. – P. 285-99

28. Shah, N. P. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia / N. P. Shah, J. M. Nicoll, B. Nagar // *Cancer Cell*. – 2002. – Vol. 2. – P. 117-125
29. Schindler, T. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase / T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena // *Science*. – 2000. – Vol. 289. – P.1938-1942.
30. Deininger, M. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells / M. Deininger, J. M. Goldman, N. B. Lydon, J. V. Melo // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – P. 3691-3698.
31. Druker, B. J. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells / B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger // *Nature medicine*. – 1996. – Vol. 2. – P. 561-566.
32. Coutre, L. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor / L. Coutre, L. Mologni, L. Cleris // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – Vol. 91. – P. 163-168.
33. Wolff N.,C. Establishment of a murine model for therapy-treated chronic myelogenous leukemia using the tyrosine kinase inhibitor STI571 / N. C. Wolff, R. L. Ilaria // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – P. 2808-2816.
34. Druker, B. J. Activity of a specific inhibitor of the BCRABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome / B. J. Druker, C. L. Sawyers, H. Kantarjian // *The New England journal of medicine*. – 2001. – Vol. 344. – P. 1038-1042.
35. Van Oosterom, A. T. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study / A. T. van Oosterom, I. Judson, J. Verweij // *Lancet*. – 2001. – Vol. 358. – P. 1421-1423.
36. Guilhot, F. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long-term benefit for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) treated with imatinib (IM) therapy: update from the IRIS study / F. Guilhot // *Blood*. – 2004. – Vol. 104.

37. Hughes, T.P. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia / T. P. Hughes, J. Kaeda, S. Branford // *The New England journal of medicine*. – 2003. – Vol. 349. – P. 1423-1432.
38. Kantarjian, H. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia / H. Kantarjian, M. Talpaz, S. O'Brien // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – P. 2873- 2878.
39. Cortes, J. Result of high-dose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α / J. Cortes, F. Giles, S. O'Brien // *Blood*. – 2003. – Vol. 102. – P. 83-86.
40. Kantarjian, H. M. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia / H. M. Kantarjian, M. Talpaz, S. O'Brien // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 473-475.
41. Gorre, M. E. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification / M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood // *Science*. – 2001. – Vol. 293. – P. 876-880.
42. Von Bubnoff, N. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukemia to STI571: a prospective study / N. von Bubnoff, F. Schneller, C. Peschel, J. Duyster // *Lancet*. – 2002. – Vol. 359. – P. 487-491.
43. Hochhaus, A. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy / A. Hochhaus, S. Kreil, A. Corbin // *Science*. – 2001. – Vol. 293. – P. 2163.
44. Al Ali, H. K. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib / H. K. Al Ali, M. C. Heinrich, T. Lange // *The Hematology Journal*. – 2004. – Vol. 5. – P. 55-60.
45. Druker, B. J. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia / B. J. Druker, N. B. Lydon // *The Journal of clinical investigation*. – 2000. – Vol. 105, № 1. – P. 3–8.

46. Deininger, M. W. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib / M. W. Deininger, B. J. Druker // *Pharmacological Reviews*. – 2003. – Vol. 55, № 3. – P. 401–423.
47. Vigneri, P. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase / P. Vigneri, J. Y. Wang // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol. 7, № 2. – P. 228–234.
48. Peng, B. Absolute bioavailability of Imatinib (Glivec®) orally versus intravenous infusion / B. Peng, C. Dutreix, G. Mehring // *Journal of Clinical Pharmacology*. – 2004. – Vol. 44, № 2. – P. 158–162.
49. Смирнов, В. В. Сравнительная фармакокинетика и биоэквивалентность двух препаратов иматиниба 400 мг в лекарственной форме таблетки, покрытые оболочкой / В. В. Смирнов, О. А. Таширова, М. Р. Хаитов // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2012. – Т. 46, № 10. – С. 45-48.
50. Peng, B. Clinical pharmacokinetics of imatinib / B. Peng, P. Lloyd, H. Schran // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2005. – Vol. 44, № 9. – P. 879–894.
51. Hensley, M. L. Imatinib treatment: specific issues related to safety, fertility, and pregnancy / M. L. Hensley, J. M. Ford // *Seminars in Hematology*. – 2003. – Vol. 40, № 2. – P. 21–25.
52. Jabbour, E. Targeted therapy in chronic myeloid leukemia / E. Jabbour, J. E. Cortes, H. Ghanem, S. O'Brien, H. M. Kantarjian // *Expert Review of Anticancer Therapy*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 99–110.
53. Talpaz M. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study / M. Talpaz, R. T. Silver, B., J. Druker // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 1928-1937.
54. Sawyers, C. L. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study / C., L. Sawyers, A. Hochhaus, E. Feldman // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 3530-3539.

55. Ottmann, O. G. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias / O. G. Ottmann, B. J. Druker, C. L. Sawyers // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – P. 1965-1971.
56. Hochhaus, A. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy / A. Hochhaus, S. Kreil, A. S. Corbin // *Leukemia*. – 2002. – Vol. 16. – P. 2190-2196.
57. Corbin, A. S. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib / A. S. Corbin, P. L. Rosee, E. P. Stoffregen, B. J. Druker, M. W. Deininger // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 4611-4614.
58. Cortes, J. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response / J. Cortes, S. O'Brien, H. Kantarjian // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. – P. 2204-2205.
59. Kim, Y-J Monitoring of BCR-ABL transcript levels after discontinuation of imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia patients achieving complete cytogenetic response [abstract] / Y-J Kim, D-W Kim, S. Lee // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. – P. 255.
60. Deininger, M. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia / M. Deininger, E. Buchdunger, B. J. Druker // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 2640-2653.
61. Sweetman, S. C. Martindale: The Complete Drug Reference / S. C. Sweetman. – 36th ed. – USA: Pharmaceutical Press, 2009. – 733 pp.
62. Manley, P. W. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor / P. W. Manley, S. W. Cowan-Jacob, E. Buchdunger, D. Fabbro, G. Fendrich, P. Furet, T. Meyer, J. Zimmermann // *European Journal of Cancer*. – 2002. – Vol. 38, № 5. – P. 19-27.
63. Veverka, M. Imatinib mesylate cocrystals: synthesis, screening, and preliminary characterization / M. Veverka, P. Simon, J. Gallovic, V. Jorik, E. Veverkova, T. Dubaj // *Monatshefte fur Chemie-Chemical Monthly*. – 2012. – Vol. 143, № 10. – P. 1405–1415.

64. Laszcz, M. Study on compatibility of imatinib mesylate with pharmaceutical excipients / M. Laszcz, B. Kosmacinska, K. Korczak, B. Smigielska, M. Glice, W. Maruszak, A. Groman, H. Beczkowicz, L. Zelazko // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2007. – Vol. 88, № 2. – P. 305–310.
65. Liu, Y. F. A facile total synthesis of imatinib base and its analogues / Y. F. Liu, C. L. Wang, Y. J. Bai, N. Han, J. P. Jiao, X. L. Qi // *Organic Process Research and Development*. – 2008. – Vol. 12, № 3. – P. 490–495.
66. Hopkin, M. D. A flow-based synthesis of Imatinib: the API of Gleevec / M. D. Hopkin, I. R. Baxendale, S. V. Ley // *Chemical communications*. – 2010. – Vol. 46, № 14. – P. 2450–2452.
67. Marull, M. Fragmentation study of imatinib and characterization of new imatinib metabolites by liquid chromatography–triple-quadrupole and linear ion trap mass spectrometers / M. Marull, B. Rochat // *Journal of mass spectrometry*. – 2006. – Vol. 41, № 3. – P. 390–404.
68. Viereck, C. An analysis of current pharmaceutical industry practices for making clinical trial results publicly accessible / C. Viereck, P. Boudes // *Clinical Trials*. – 2009. Vol. 30. – P. 293-299.
69. Ярошенко, Д. В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии: дис. канд. хим. наук: 02.00.02 / Ярошенко Дмитрий Вадимович. – СПб., 2014. – 153 с.
70. Айвазов, Б. В. Введение в хроматографию: учебное пособие для хим. спец. вузов / Б. В. Айвазов. – М.: Высш. шк., 1983. – 240 с.
71. Рудаков, О. Б. Спутник хроматографа. Методы жидкостной хроматографии / О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров, А. А. Филиппов, В. Ф. Селеменев, А. А. Приданцев. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.
72. Стыскин, Е. Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е. Л. Стыскин, Л. Б. Ициксон, Е. В. Брауде. – М.: Химия, 1986. – 172 с.

73. Энгельгардт, Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях / Х. Энгельгардт. – М.: Мир, 1980. – 245 с.
74. Шатц, В. Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
75. Краснов, Е. А. Современные хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ) в фармацевтическом анализе: учебно-методическое пособие / Е. А. Краснов, А. А. Блинникова. – Томск: 2003. – 144 с.
76. Барам, Г. И. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных средств / Г. И. Барам, Д. В. Рейхарт, Е. Д. Гольдберг, Б. Н. Изотов, М. О. Родинко, В. А. Хазанов // Фарматека. – 2003. – № 11. – С. 71-74.
77. Хенке, Х. Жидкостная хроматография / Х. Хенке. – М.: Техносфера, 2009. – 264 с.
78. Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Беккер. – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
79. Сычев, К. С. Практический курс жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – Кокоро, 2013. – 272 с.
80. Jin, H. Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC-QToF mass spectrometry / H. Jin, A. P. Kumar, D. Paik, K. Ha, Y. Yoo, Y. Lee // Microchemical Journal. – 2010. – Vol. 94, № 2. – P. 139-147.
81. Schneider, M. J. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection / M. J. Schneider, S. E. Braden, I. Reyes-Herrera, D. J. Donoghue // Journal of Chromatography B. – 2007. – Vol. 846, № 1-2. – P. 8-13.
82. Wang, L. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics / L. Wang, J. Peng, L. Liu // Analytica Chimica Acta. – 2008. – Vol. 630, № 1. – P. 101-106.

83. Wang L. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography / L. Wang, H. Yang, C. Zhang, Y. Mo, X. Lu // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 619, № 1. – P. 54-58.
84. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А. Т. Лебедев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Техносфера, 2015. – 704 с.
85. Экман, Р. Масс-спектрометрия: аппаратура, толкование и приложения / Р. Экман, Е. Зильберинг, Э. Вестман-Бринкмальм, А. Край; под ред. А.Т. Лебедева. – М.: Техносфера, 2013. – 368 с.
86. Лаваньини, И. Количественные методы в масс-спектрометрии / И. Лаваньини, Ф. Маньо, Р. Сералья, П. Тральди; под ред. Е. Н. Николаева. – М.: Техносфера, 2008. – 176 с.
87. Исаев, Р. Н. Масс-спектрометрия и ее применение: учебное пособие / Р. Н. Исаев. – Барнаул: изд. Алт. ун-та, 1990. – 75 с.
88. De Francia, S. New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human plasma / S. De Francia, A. D'Avolio, F. De Martino, E. Pirro, L. Baietto, M. Siccardi, M. Simiele, S. Racca, G. Saglio, F. Di Carlo, G. Di Perri // *Journal of Chromatography B*. – 2009. – Vol. 877. – P. 1721-1726.
89. Francis, J. A simple and rapid method for the quantification of imatinib mesylate and desmethyl imatinib in human plasma using LC-MS/MS and its application to routine therapeutic drug monitoring / J. Francis, B. Dubashi, R. Sundaram, S. C. Pradhan, A. Chandrasekaran // *World Journal of Pharmaceutical Research*. – 2014. – Vol. 3, № 5. – P. 1067-1075.
90. Yang, J. S. Rapid determination of imatinib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry: application to a pharmacokinetic study / J. S. Yang, E. G. Cho, W. Huh, J-W Ko, J. A. Jung, S-Y Lee // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2013. – Vol. 34, № 8. – P. 2425-2430.
91. Lankheet, N. A. Method development and validation for the quantification of dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in

human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / N. A. Lankheet, M. J. Hillebrand, H. Rosing, J. H., Schellens, J. H. Beijnen, A. D. Huitema // *Biomedical chromatography*. – 2013. – Vol. 4. – P. 466-476.

92. Haouala, A. Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry / A. Haouala, B. Zanolari, B. Rochat, M. Montemurro, K. Zaman, M. A. Duchosal, H. B. Ris, S. Leyvraz, N. Widmer, L. A Decosterd // *Journal of chromatography B*. – 2009. – Vol. 877, № 22. – P. 1982-1996.

93. Miura, M. Quantitative determination of imatinib in human plasma with High-Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection / M. Miura, N. Takahashi, K. Sawada // *Journal of Chromatographic Science*. – 2011. – Vol. 49. – P. 412-415.

94. Pirro, E. A new HPLC-UV validated method for therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors in leukemic patients / E. Pirro, S. De Francia, F. De Martino, C. Fava, S. Ulisciani, G. R. Cambrin, S. Racca, G. Saglio, F. Di Carlo // *Journal of Chromatographic Science*. – 2011. – Vol. 49. – P. 753-757.

95. Davies, A. Simultaneous determination of nilotinib, imatinib and its main metabolite (CGP-74588) in human plasma by ultra-violet high performance liquid chromatography / A. Davies, A. K. Hayes, K. Knight, S. J. Watmough, M. Pirmohamed, R. E. Clark // *Leukemia Research*. – 2010. – Vol. 34. – P. 702-707.

96. Roth, O. Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: comparison with LC-MS/MS / O. Roth, O. Spreux-Varoquax, S. Bouchet, P. Rousselot, S. Castaigne, S. Rigaudeau, V. Raggiueneau, P. Therond, P. Devillier, M. Molimard, B. Maneglier // *Clinica Chimica Acta*. – 2010. – Vol. 411. – P. 140-146.

97. Adeagbo, B. A. A simple HPLC-UV method for pharmacokinetic studies of imatinib in the presence of common anti-malaria agents / B. A. Adeagbo, T. A. Olugbade, O. O. Bolaji, M. A. Durosinmi // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. – 2015. – Vol. 38. – P. 31-49.

98. Dziadosz M. Imatinib quantification in human serum for clinical purposes using high-performance liquid chromatography with diode array detector / M. Dziadosz, H. Bartels // *Acta Chimica Slovenica*. – 2011. – Vol. 58. – P. 347-350.

99. Golabchifar A. A. Optimization of the simultaneous determination of imatinib and its major metabolite, CGP74588, in human plasma by a rapid HPLC method using D-optimal experimental design / A. A. Golabchifar, M. R. Rouini, B. Shafaghi, S. Rezaee, A. Foroumadi, M. R. Khoshayand // *Talanta*. – 2011. – Vol. 85. – P. 2320-2329.

100. Мидруев, Е. Ю. Определение противоопухолевого препарата иматиниба в плазме крови человека с помощью метода сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. Ю. Мидруев, И. Е. Шохин, Ю. В. Медведев, Т. Н. Комаров, Т. А. Ярушок // *Естественные и технические науки*. – 2014. – № 9-10. – С. 103-111.

101. Шарафутдинов, Р. Н. Пробоотбор и пробоподготовка в количественном химическом анализе: учебное пособие / Р. Н. Шарафутдинов, М. Н. Мифтахов, Г. В. Маврин. – Набережные Челны: КП(Ф)У, 2015. – 101 с.

102. Карпов, Ю. А. Методы пробоотбора и пробоподготовки / Ю. А. Карпов, А. П. Савостин. – 2-е изд. (эл.). – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 243 с.

103. Сычев, К. С. Подготовка пробы в газовой и жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – Кокоро, 2012. – 155 с.

104. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1: [Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2014]. – М.: Гриф и К, 2014. – 328 с.

105. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009. – 23 pp.

106. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM): USA, 2001. – 34 pp.

107. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: [Методические указания: утверждены Минздравсоцразвития РФ, 2008 г.]. – М., 2008. – 32 с.
108. ГОСТ Р 52379–2005 Надлежащая клиническая практика. – М.: Стандартинформ, 2005. – 39 с.
109. Снайдер, Л. Р. Высокопроизводительная градиентная элюция: практическое применение модели линейного изменения элюирующей силы растворителя / Л. Р. Снайдер, Д. У. Долан; пер. с англ. С. Б. Гомбоевой и О. А. Петуховой, под общ. ред. М.Б. Бару. – М.: Техносфера, 2015. – 584 с.
110. Сапрыкина, Л. В. Новые методические приемы разделения высокополярных соединений в практике ВЭЖХ: дис. канд. хим. наук: 05.11.11 / Сапрыкина Лидия Викторовна. – Краснодар, 2008. – 134 с.
111. Сычев, С. Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ / С. Н. Сычев. – Орел, 2000. – 212 с.
112. Эллисон, С. Л. Валидация аналитических методик. Неопределенность в аналитических измерениях / С. Л. Эллисон, А. Уильямс; пер. с англ. под ред. Г. Р. Нежиховского и Р.Л. Кадиса. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2016. – 312 с.
113. Эрмер, Й. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик / Й. Эрмер, Д. Х. Макб. Миллер; пер. с англ. под ред. А.В. Александрова. – М.: Группа компаний Виалек, 2013. – 512 с.
114. Причард, Э. Контроль качества в аналитической химии / Э. Причард, В. Барвик; пер. с англ. под ред. И. В. Болдырева. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2014. – 320 с.
115. Эпштейн, Н. А. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ / Н. А. Эпштейн, С. В. Емшанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Том 42, № 11. – С. 34-40.

Приложение 1.

Сертификат качества на фармацевтическую субстанцию иматиниба мезилата

Synthon, s.r.o. Hlavní 12 - c.p. 187 178 01 Hradec Czech Republic Tel: +420 539 427 333 Fax: +420 539 437 550 e-mail: info@synthon.cz; sales@synthon.cz www.synthon.com			
Certificate of Analysis			
Imatinib mesylate API			
Lot Number	: 1606469		
Item Number	: 283080	Date of Manufacture	: 01-May-2012
Re-test Date	: Apr-2015		
Manufacturing Site	: ZHEJIANG JIUZHOU PHARMACEUTICAL CO		
Test	Result	Specification	
Appearance	Complies	White to pale yellow powder	
Identification			
IR spectrum	Complies	The same as Std. Prep.	
HPLC retention time	Complies	The same as Std. Prep.	
Water content	0.2 %	≤ 0.5 %	
Sulfurated ash	<0.1 %	≤ 0.1 %	
Heavy metals	Complies	≤ 0.001 %	
Residual solvents (GC) (US man. by Synthon)			
Acetonitrile	Not Performed	Not routinely performed. If tested: ≤ 0.041%	
Pyridine	Not Performed	Not routinely performed. If tested: ≤ 0.020%	
Methanol	Not Performed	Not routinely performed. If tested: ≤ 0.20%	
2-Propanol	Not Performed	≤ 0.5 %	
N,N-Dimethylformamide	Not Performed	Not routinely performed. If tested: ≤ 0.080%	
Residual solvents (GC) (US man. by Jiu Zhou)			
Acetone	0.31 %	≤ 0.8 %	
Dichloromethane	0.01 %	Not routinely performed. If tested: ≤ 0.06 %	
2-Butanol	≤ 0.05 %	Not routinely performed. If tested: ≤ 0.5 %	
Impurities (HPLC)			
G-604 (IMA-II)	≤ 0.05 %	≤ 0.10 %	
Largest unspecified impurity	≤ 0.05 %	≤ 0.10 %	
Total impurities	≤ 0.05 %	≤ 1.0 %	
G-609 (IMA-III)	≤ 1 ppm	≤ 10 ppm	
Assay (anhydrous basis)			
HPLC	100.4 %	98.0 - 102.0 %	
Alkaline titration	100.6 %	98.0 - 102.0 %	
Certificate of Analysis Version: 1			
Agree: ZJCB Date: 16.Apr.2014 (HAI) (JZ from LDB Prod)			

Приложение 2.

Акт внедрения методики

УЧАСТНИК ИННОВАЦИОННОГО ТЕРРИТОРИАЛЬНОГО КЛАСТЕРА «ФАРМАЦЕВТИКА, МЕДИЦИНСКАЯ
ТЕХНИКА И ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ»



Аккредитованный ЦКП Технопарка «Сколково»

Адрес: 634021, г. Томск, ул. Елизаровых, 79/4
Почтовый адрес: 634034, г. Томск, а/я 381
Тел.: (3822) 24-87-07, 24-87-13, факс: 24-87-21
www.iphar.ru, e-mail: mail@iphar.ru
ИНН 7017105357, КПП 701 701 001

Акт

внедрения в практику работы ООО «Ифар»
результатов научного исследования

Результаты диссертационной работы Леонова К.А. «Количественное определение иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ» внедрены в практику Лаборатории аналитической химии Отдела фармацевтических разработок ООО «Ифар» с 01.10.2015 г. Разработанная методика хроматографического анализа и методика пробоподготовки для извлечения иматиниба из плазмы крови человека используются при различных фармакокинетических исследованиях, в том числе клиническом исследовании биозэквивалентности.

Генеральный директор ООО «Ифар»
д.м.н., профессор



В.А. Хазанов