

На правах рукописи

Яичков Илья Игоревич

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
В ПЛАЗМЕ И ПРОВЕДЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
МИКОФЕНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ, МЕТИЛДОПЫ И МЕБЕВЕРИНА,
СОДЕРЖАЩИХ ПОТЕНЦИАЛЬНО НЕСТАБИЛЬНЫЕ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

Волгоград, 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Хохлов Александр Леонидович - доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор

Официальные оппоненты:

Оковитый Сергей Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Каленикова Елена Игоревна - доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6

Защита состоится «___» 2019 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «___» _____ 201 г.

Ученый секретарь

**Диссертационного Совета,
доктор биологических наук**

Бугаёва Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

При проведении исследований фармакокинетики лекарственных препаратов, особенно на этапе клинических испытаний, необходимо количественное определение лекарственных веществ (ЛВ), а в некоторых случаях, их метаболитов в биологических жидкостях. Одной из наиболее сложных задач данных исследований является измерение концентрации веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы. Данные соединения способны разрушаться на различных этапах исследования, таких как отбор крови, хранение образцов, замораживание и размораживание образцов, выполнение анализов [под ред. А.Л. Хохлова, 2018; Li W., 2013]. Этой проблеме посвящён ряд обзоров, в которых приведены примеры веществ и меры, предпринятые для предупреждения их разложения [Briscoe C.J., 2009; Dell D., 2004; Hilhorst M., 2015; Li W., 2013]. Однако, в этих публикациях не приведено подробное описание процесса разработки методики и последовательности действий при подборе условий замедления деградации данных соединений.

Наиболее частыми причинами нестабильности молекул аналита или его метаболитов является окисление и гидролиз [под ред. А.Л. Хохлова, 2018; Briscoe C.J., 2009; Dell D., 2004; Hilhorst M., 2015; Li W., 2013]. В качестве примеров легкоокисляющихся соединений для выполнения исследования выбраны вещества, содержащие в своей структуре фенольные гидроксилы [Briscoe C.J., 2009; Dell D., 2004]. Глюкуроны лекарственных веществ использовались в качестве примера легкогидролизуемых соединений, т.к. путём глюкуроновой конъюгации метаболизируется большинство молекул ксенобиотиков, содержащих в структуре гидроксильные и карбоксильные группы [Li W., 2013]. Для проведения исследования были выбраны микофеноловая (МФК) и деметилированная мебевериновая кислота (ДМК), которые содержат один фенольный гидроксил, и метилдопа, которая содержит два фенольных гидроксильных. При этом МФК метаболизируется с образованием О-ацилглюкуронида (АГМФК) и фенольного глюкуронида (ФГМФК), а ДМК – фенольный глюкуронид (ФГДМК) [Kristinsson J., 1993; Maddela, R., 2017; Ohyama, K., 2008; Shipkova, M., 2009; Wiesen M.H.J., 2012]. Следует отметить, что данные представители ЛВ и их метаболитов были выбраны из множества примеров нестабильных соединений, т.к. все методики разрабатывались для проведения заранее запланированных исследований биоэквивалентности и фармакокинетики их лекарственных препаратов.

Степень разработанности темы

На настоящий момент известны результаты 5 исследований БЭ препаратов микофенолата мофетила [Almeida S., 2010; Bahrami G., 2006; Patel S., 2011; Upadhaya V., 2014; Zhang Q., 2010]. Изучение БЭ таблеток микофенолата натрия ранее проводилось. В ряде работ, посвящённых биоаналитическим исследованиям микофеноловой кислоты авторы используют буфер-

ные растворы, а также растворы кислот для предотвращения обратной конверсии её фенольного глюкуронида и ацилглюкуронида [Benoit-Biancamano M.O., 2007; Brandhorst G., 2006; Chen B., 2007; Mino Y., 2008; Ohyama K., 2008; Shipkova M., 2009]. В других публикациях указано, что гидролиз данных метаболитов является незначительным, и добавление стабилизаторов не требуется [Heinig K., 2010; Li W., 2013]. Однако, в большинстве исследований изучение данного явления не проводилось [Almeida S., 2010; Carlucci F., 2007; Daurel-Receveur M., 2006; Elbarty F.A., 2007; Hosotsubo H., 2001; Maddela R., 2017; Ohyama K., 2008; Upadhyay V., 2014; Willis, C., 2002; Zhong Y., 2006]. Поэтому изучение обратной конверсии конъюгатов микофеноловой кислоты является актуальным.

При сравнении фармакокинетики капсул и таблеток мебеверина рассчитывались ФК параметры ДМК [Winsemius A., 2002], при изучении ФК таблеток мебеверина определяли концентрации в плазме мебевериновой кислоты (МК) и мебеверинового спирта (МС) [Stockis A., 2002], а также ДМК, ДМК и МС [Moskaleva N.E., 2017]. Таким образом, подходы к проведению их фармакокинетических исследований МБ отличаются. Общими недостатками методик количественного определения ДМК и других метаболитов мебеверина в плазме и сыворотке крови методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС являются длительная и трудоёмкая процедура подготовки проб с применением твёрдофазной (ТФЭ) [Bahrami G., 2006; Elliott S., 2006; Khatri C.A., 2010; Moskaleva N.E., 2017; Oliveira C.H., 2002; Stockis A., 2002; Valizadeh H., 2010] и жидкостно-жидкостной (ЖЖЭ) экстракции и низкая чувствительность [Vlase L., 2013]. Стабильность фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты в плазме в процессе хранения также не была изучена.

В зарубежной литературе опубликованы результаты 4 исследований БЭ метилдопы [Bahrami G., 2006; Oliveira C.H., 2002; Rona K., 2001; Valizadeh H., 2010]. Недостатками биоаналитических методик определения данного соединения в плазме крови с применением ВЭЖХ с флюориметрическим [Bahrami G., 2006; Oliveira C.H., 2002] и tandemным масс-спектрометрическим [Rona K., 2001; Vlase L., 2013] детектированием, использованных при выполнении данных работ, также являются длительная пробоподготовка с применением жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции [Bahrami G., 2006, Oliveira C.H., 2002, Rona K., 2001] и низкая чувствительность [Vlase L., 2013].

В отечественной и зарубежной литературе опубликованы статьи по биоаналитическим исследованиям веществ, включающих в структуру фенольные гидроксилы и образующих глюкуроновые конъюгаты, как с применением растворов стабилизаторов, так и без их использования [Almeida S., 2010; Bahrami G., 2006; Benoit-Biancamano M.O., 2007; Brandhorst G., 2006; Carlucci F., 2007; Chen B., 2007; Daurel-Receveur M., 2006; Elbarty F.A., 2007; Elliott S., 2006; Heinig K., 2010; Hosotsubo H., 2001; Khatri C.A., 2010; Li W., 2013; Maddela R., 2017; Mino Y., Mos-

kaleva N.E., 2017; 2008; Ohyama K., 2008; Oliveira C.H., 2002; Shipkova M., 2009; Upadhyay V., 2014; Valizadeh H., 2010; Vlase L., 2013; Willis, C., 2002; Zhong Y., 2006]. Анализ данных источников свидетельствует о том, что подходы к разработке методик количественного определения соединений, содержащих в структуре потенциально нестабильные функциональные группы, в биологических жидкостях отсутствуют.

Цель исследования:

Разработать биоаналитические методики определения микофеноловой кислоты, деметилированной мебевериновой кислоты совместно с мебевериновой кислотой и метилдопы в плазме и провести изучение биоэквивалентности таблеток микофенолата натрия и метилдопы и фармакокинетики капсул мебеверина.

Задачи исследования:

1. Провести изучение стабильности микофеноловой кислоты, деметилированной мебевериновой кислоты и метилдопы в плазме крови и, при необходимости, осуществить подбор стабилизатора.
2. Оценить влияние обратной конверсии глюкуронидов микофеноловой кислоты и фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты в плазме в процессе хранения и выполнения анализов на точность определения концентраций данных аналитов и, при необходимости, провести выбор стабилизатора.
3. Валидировать аналитические методики количественного определения в плазме крови микофеноловой кислоты методами ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот методом ВЭЖХ-МС/МС, метилдопы методом ВЭЖХ-МС/МС.
4. Осуществить перекрёстную валидацию ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС-методик определения микофеноловой кислоты на образцах плазмы, полученных от нелинейных крыс.
5. Установить подходы к разработке биоаналитических методик определения соединений, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и образующих в процессе метаболизма глюкурониды.
6. Провести изучение биоэквивалентности таблетированных форм микофеноловой кислоты и метилдопы.
7. Выполнить сравнение фармакокинетических параметров мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот и их концентраций в плазме в точках отбора проб после однократного приёма препарата мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением.

Научная новизна

Впервые проведено изучение биоэквивалентности микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой, в дозировке 360 мг, в рамках которого были впервые рассчитаны фармакокинетические параметры микофеноловой кислоты после однократного приёма данного препарата здоровыми добровольцами. Впервые разработаны методики определения микофеноловой кислоты в плазме с применением ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, которые имеют сравнимый с ВЭЖХ-МС/МС уровень чувствительности.

Впервые проведено исследование биоэквивалентности воспроизведённого тестируемого препарата метилдопы российского производства. Впервые подобран способ предотвращения окисления метилдопы в плазме крови.

Впервые рассчитаны фармакокинетические параметры мебевериновой кислоты после приёма мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением в дозировке 200 мг. Установлена корреляция между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови. Впервые при ВЭЖХ-МС/МС- определении мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови использован метод осаждения белков без концентрирования для пробоподготовки. При этом доказано отсутствие обратной конверсии фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты как в процессе хранения образцов, так и в процессе масс-спектрометрического детектирования.

Впервые сформулированы подходы к разработке методик определения в плазме крови веществ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и метаболизирующихся путём глюкуроновой конъюгации.

Теоретическая и практическая значимость темы

В результате выполненного исследования проведено обобщение данных литературы о стабилизации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях. Подходы к разработке биоаналитических методик, сформулированные на основании изучения веществ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и метаболизирующихся путём глюкуроновой конъюгации, могут быть использованы при анализе всех групп нестабильных соединений.

Методики определения микофеноловой кислоты, метилдопы и метаболитов мебеверина в плазме внедрены в практическую деятельность биоаналитических лабораторий ООО «Квинта-аналитика Ярославль» и Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского» для проведения фармакокинетических исследований. Методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме также внедрены в практическую деятельность химикотоксикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование включало в себя два экспериментальных этапа. На первом этапе была выполнена разработка и валидация биоаналитических методик для определения изучаемых соединений, а также перекрёстная валидация методик определения микофеноловой кислоты на образцах плазмы, полученных от крыс. Вторым этапом исследования было проведение исследований биоэквивалентности таблеток микофеноловой кислоты и метилдопы и фармакокинетики капсул мебеверина на здоровых добровольцах.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно осуществил постановку целей и задач исследования, обзор и систематизацию данных литературы, статистическую обработку полученных данных, сформулировал подходы к разработке биоаналитических методик определения потенциально нестабильных соединений. Автор принимал непосредственное участие в проведении экспериментальной части работы: разработке и валидации методик, проведении анализа образцов, полученных от добровольцев и лабораторных животных. Автору принадлежит ведущая роль в подготовке публикаций, заявок на патенты, обсуждении и внедрении основных результатов диссертации.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертации гарантирована использованием современных инструментальных методов анализа, а также полной валидацией всех разработанных методик. Полученные в ходе валидации и фармакокинетических исследований данные подвергнуты статистической обработке с помощью прикладных статистических пакетов.

Результаты диссертационной работы апробированы на XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (2017), II международной конференции «Исследования лекарственных препаратов: простые и сложные задачи» (2017), 72-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (2018), V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (2018).

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 в журналах, рекомендованных ВАК, 2 монографии, а также получены 3 решения о выдаче патента.

Положения, выносимые на защиту

1. При проведении биоаналитических исследований микофеноловой кислоты в качестве антикоагулянта следует использовать К₃ЭДТА с целью минимизации гидролиза её глюкуронидов в плазме.
2. Для предотвращения разложения метилдопы в качестве антикоагулянта необходимо применять К₃ЭДТА, а также добавлять к плазме раствор стабилизатора, содержащий смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, из расчёта 0,2 мл раствора стабилизатора на 1 мл плазмы крови.

3. Результаты проведённых исследований сравнительной фармакокинетики свидетельствуют о биоэквивалентности тестируемого препарата метилдопы референтному препарату «Допегит» и отсутствию биоэквивалентности тестируемого препарата микофенолата натрия и референтного препарата «Майфортик».

4. Между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислоты в промежутке от 0,5 ч до 8,0 ч после приёма препарата «Дюспаталин» в форме капсул с пролонгированным высвобождением присутствует достоверная положительная корреляция.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 181 странице машинописного текста, содержит 51 рисунок и 64 таблицы, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, обсуждения результатов исследования, общих выводов, практических рекомендаций, 7 приложений и глав, в которых описан процесс разработки биоаналитических методик, и приведены результаты проведённых исследований биоэквивалентности и фармакокинетики. Список литературы включает 188 источников, в том числе 145 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе (обзор литературы) проанализированы особенности проведения фармакокинетических исследований препаратов микофеноловой кислоты, мебеверина и метилдопы, описаны методики определения данных соединений и их метаболитов в биологических жидкостях с указанием их основных недостатков. Далее изложены основные способы, применяемые для предотвращения разложения веществ в пробах биологических жидкостей. Подробно описаны химические свойства фенольных соединений и глюкуронидов лекарственных веществ и факторы, влияющие на их стабильность. Структурные формулы изучаемых соединений представлены на рис. 1.

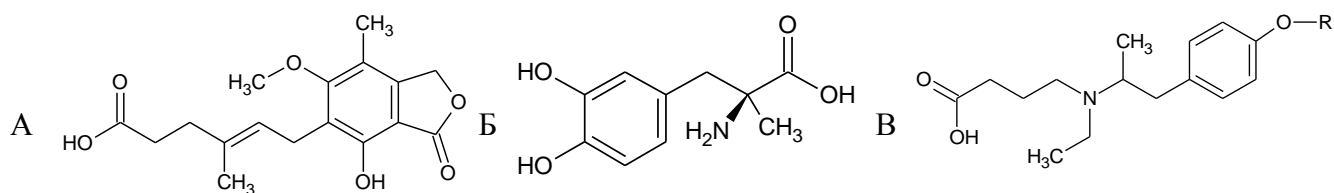


Рисунок 1. Структурные формулы МФК (А), МД (Б), ДМК (В; R=H) и МК (В; R=CH₃)

Во второй главе (материалы и методы) приведён дизайн исследования (рис. 2), перечень используемого оборудования, реактивов, использованных в исследовании, описан процесс приготовления стандартных образцов определяемых веществ. Изложен объём проводимых при валидации испытаний и критерии их приемлемости, а также порядок проведения аналитического цикла. С целью перекрёстной валидации разработанных методик определения микофеноловой кислоты, а также изучения обратной конверсии АГМК в процессе хранения в плазме бы-

ло проведено исследование фармакокинетики на 10 нелинейных крысах-самцах массой 250 ± 10 г. При этом субстанцию микрофенолата натрия вводили крысам перорально в виде водного раствора в дозировке 33,0 мг/кг. Образцы крови забирались через 2 ч после приёма, т.к., согласно данным литературы, этот момент соответствует времени достижения максимальной концентрации ФГМФК и АГМФК [Liu Q., 2017; Yoshimura K., 2017]. Затем часть от каждого образца плазмы подвергалась немедленной пробоподготовке и анализировалась с применением разработанных методики, другая часть – замораживалась до температуры не выше -20°C для последующего изучения обратной конверсии ФГМФК и АГМФК в процессе хранения. Данное испытание было проведено в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики ЕАЭС (2017).



Рисунок 2. Дизайн исследований

Клинические исследования биоэквивалентности (БЭ) препаратов микрофенолата натрия и метилдопы и фармакокинетики препарата мебеверина выполнялись после экспертизы Совета по этике и получения разрешения от МЗ РФ в ГАУЗ ЯО КБ №2. Критерии включения и не-включения добровольцев в исследования установлены согласно требованиям руководства ЕАЭС по проведению исследований БЭ (2017).

Изучение БЭ тестируемого препарата микрофенолата натрия¹ в форме таблеток, покрытых оболочкой в дозировке 360 мг было проведено на 48 здоровых добровольцах [МУ ФГУ НЦЭСМП, 2008; Kuypers D.R., 2010; Yu C.-Z., 2017; Zhang J., 2017]. В исследуемую популяцию

¹ Название и производитель тестируемого препарата не названы по требованию спонсора исследования

вошли 34 женщины и 14 мужчин европеоидной расы в возрасте от 18 до 43 лет. Средний возраст испытуемых составил $26,3 \pm 8,2$ лет, рост $168,0 \pm 9,1$ см, вес $61,8 \pm 9,0$ кг, ИМТ $21,9 \pm 2,3$ кг/м². В качестве референтного препарата был выбран «Майфортик» («Новартис», Швейцария; номер серии: S0347, дата: 12.2014). Данное исследование по дизайну является открытым рандомизированным перекрестным. Отмывочный период составил 14 дней. Для отбора образцов были выбраны следующие временные точки [Delavenne X, 2011; Jonhston A., 2006]: до приёма, через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч после приема ЛП.

Исследование БЭ метилдопы² в форме таблеток в дозировке 250 мг также являлось открытым рандомизированным перекрестным с отмывочным периодом 7 дней. В качестве референтного препарата были выбраны таблетки «Допегит» в аналогичной дозировке («ЭГИС», Венгрия; серия D358N1014, срок годности: до 10.2019) [ГРЛС; ФЗ №61-ФЗ; Oliveira С.Н., 2002; Рона К., 2001]. В популяцию было включено на 24 здоровых добровольцах [Oliveira С.Н., 2002, Рона К., 2001]: 12 женщин и 12 мужчин европеоидной расы в возрасте от 18 до 40 лет; их средний возраст составил $25,4 \pm 7,3$ лет, рост $171,0 \pm 9,0$ см, вес $65,8 \pm 7,2$ кг, ИМТ $22,7 \pm 2,4$ кг/м². Отбор проб крови производился до приёма препарата и через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1 ч 15 мин, 1,5 ч, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 15 мин, 2,5 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 9 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч после приёма ЛП [Oliveira С.Н., 2002].

Изучение фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением в дозировке 200 мг («Дюспаталин», производство «Эбботт Хелскеа САС» номер серии: 10215, годен до 04.17) проводилось на 24 здоровых добровольцах [Winsemius A., 2002]. В популяцию для оценки фармакокинетических параметров было включено 13 женщин и 11 мужчин европеоидной расы в возрасте от 18 до 45 лет. Средний возраст добровольцев составил $27,5 \pm 6,9$ лет, рост $170,2 \pm 7,5$ см, вес $67,0 \pm 11,8$ кг, ИМТ $23,0 \pm 2,8$ кг/м². Отбор образцов крови выполняли до приема препарата и через 30 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 24 ч после приема ЛП [Moskaleva N.A., 2017; Winsemius A., 2002].

В третьей главе описан процесс разработки методик определения изучаемых веществ в плазме, и приведены результаты их валидации.

Для определения микофеноловой кислоты в плазме методом ВЭЖХ-МС/МС были выбраны следующие условия: *Хроматографическое разделение*: колонка Phenomenex Kinetex C₁₈ (30*4,6 мм, 2,6 мкм) с предколонкой Phenomenex Security guard C₁₈ (4*3,0 мм, 5 мкм), скорость потока - 0,4 мл/мин; градиентное элюирование (табл. 1); объём вводимой пробы – 5 мкл; температура – комнатная. *Масс-спектрометрическое детектирование*: способ ионизации – электроспрей с термофокусировкой; полярность – отрицательная; режим MRM: для МФК -

² Название и производитель тестируемого препарата не названы по требованию спонсора исследования

319→191+205 m/z; для МФК-D₃ - 322→191+205 m/z. *Пробоподготовка:* к 50 мкл плазмы добавляли 450 мкл раствора МФК-D₃ в концентрации 1,5 мкг/мл в метаноле, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин.

Таблица 1
Программа градиентного элюирования при ВЭЖХ-МС/МС определении микофеноловой кислоты

Время, мин.	0,0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,5
Ацетонитрил, % (об.)	40	40	65	90	90	65	40	40
Вода, % (об.)	60	60	35	10	10	35	60	60

Данные параметры хроматографического процесса позволяют полностью разделить МФК и её фенольный глюкуронид, который подвержен фрагментации в источнике ионов (рис. 3). Результаты предварительной оценки стабильности МФК с применением К₃ЭДТА и гепарината лития в качестве антикоагулянтов указывают на отсутствие необходимости в использовании антиоксиданта: значения концентрации находились в диапазоне 85,0-115,0% (табл. 2). Изучение обратной конверсии ФГМФК проводилось на образцах с концентрацией данного метаболита 100 мкг/мл [Delavenne X., 2010; Elbarty, 2007; Patel C.G., 2006]. При использовании обоих антикоагулянтов уровень обратной конверсии ФГМФК оставался на допустимом уровне: не более 20% от площади хроматографического пика образца НПКО. Для дальнейшего исследования в качестве антикоагулянта был выбран К₃ЭДТА, т.к. относительное количество гидролизованного метаболита после 24 ч хранения при комнатной температуре составило 2,58% от площади хроматографического пика образца НПКО, что в 3 раза меньше, чем при использовании гепарината лития.

Таблица 2
Результаты предварительного оценки стабильности изучаемых соединений в плазме

	% от начальной концентрации, n=3					
	Микофеноловая кислота		Деметилированная метабевериновая кислота		Метилдопа	
	К ₃ ЭДТА	Гепаринат лития	К ₃ ЭДТА	Гепаринат лития	К ₃ ЭДТА	Гепаринат лития
Антикоагулянт						
Краткосрочная стабильность (24 ч при комн. темп.)	99,8	101,1	99,2	102,1	30,3	47,2
Стабильность при замораживании/размораживании (3 цикла)	100,6	97,2	99,2	97,0	80,0	93,2

Таблица 3
Оценка обратной конверсии ФГМФК в процессе хранения в плазме

		% от площади хром. пика МФК образца НПКО			
		НПКО методики 0,5 мкг/мл (ВЭЖХ-МС/МС), n=6		НПКО методики 0,05 мкг/мл (ВЭЖХ-МС), n=2	
		К ₃ ЭДТА	Гепаринат лития	К ₃ ЭДТА	Гепаринат лития
Время хранения образца при комнатной температуре, ч	2 ч	-*	-	6,0	23,9
	6 ч	-	-	17,0	75,2
	8 ч	-	-	22,3	120,6
	24 ч	2,58	7,44	45,2	154,3

*анализ не проводился

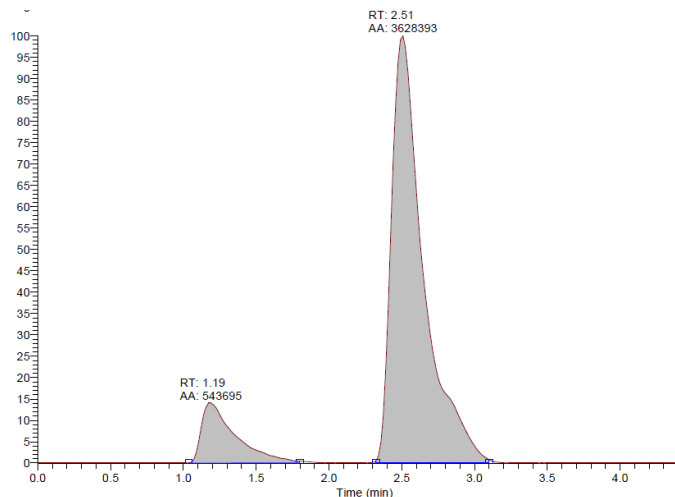


Рисунок 3. MRM-хроматограмма смеси, содержащей МФК и ФГМФК, при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС

Для обеспечения возможности детектирования следовых количеств микофеноловой кислоты при проведении фармакокинетических исследований НПКО ВЭЖХ-МС-методики был снижен до 0,05 мкг/мл. Используемые в ВЭЖХ-МС/МС - методе параметры не позволили достичь нужной чувствительности. Поэтому были выбраны следующие условия: *Хроматографическое разделение*: Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (100*4,6мм, 3,5 мкм), скорость потока - 0,6 мл/мин; изократическое элюирование – ПФ: ацетонитрил, вода и 0,1% раствор муравьиной кислоты - 50:45:5 (об./об./об.) температура термостата - 40°C; объём вводимой – 5 мкл. *Масс-спектрометрическое детектирование*: способ ионизации электроспрей с термофокусировкой; полярность – отрицательная; режим SIM: МФК – 319 m/z. *Пробоподготовка*: к 50 мкл плазмы добавляли 200 мкл метанола, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек и центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин. Данные условия позволяют хроматографически разделить МФК и ФГМФК (рис. 4).

При данном уровне НПКО гидролиз ФГМФК при применении К₃ЭДТА не превышал максимально допустимого уровня в течение 6 ч, а при применении гепарината лития - в течение 2 ч, что значительно меньше (табл. 3). Обратная конверсия данного метаболита полностью отсутствовала при хранении плазмы при температуре не выше -20°C в течение 1 мес, а также депротенинизата плазмы в автосемплере (24 ч), в течение 3 циклов заморозки/разморозки. Повторный анализ образцов, полученных от лабораторных животных спустя 1 мес., выполненный с помощью ВЭЖХ-МС-методики, показал, что среднее значение различий между результатами измерений составило 1,12%, минимальное значение - -3,43%, максимальное значение - 9,49%. Это соответствует установленным требованиям: ±20% для более 67% образцов. Таким образом, хранение образцов при температуре -20°C позволили сохранить уровень обратной конверсии ФГМФК и АГМФК на допустимом уровне. Поэтому при проведении биоаналитических исследований микофеноловой кислоты следует применять К₃ЭДТА.

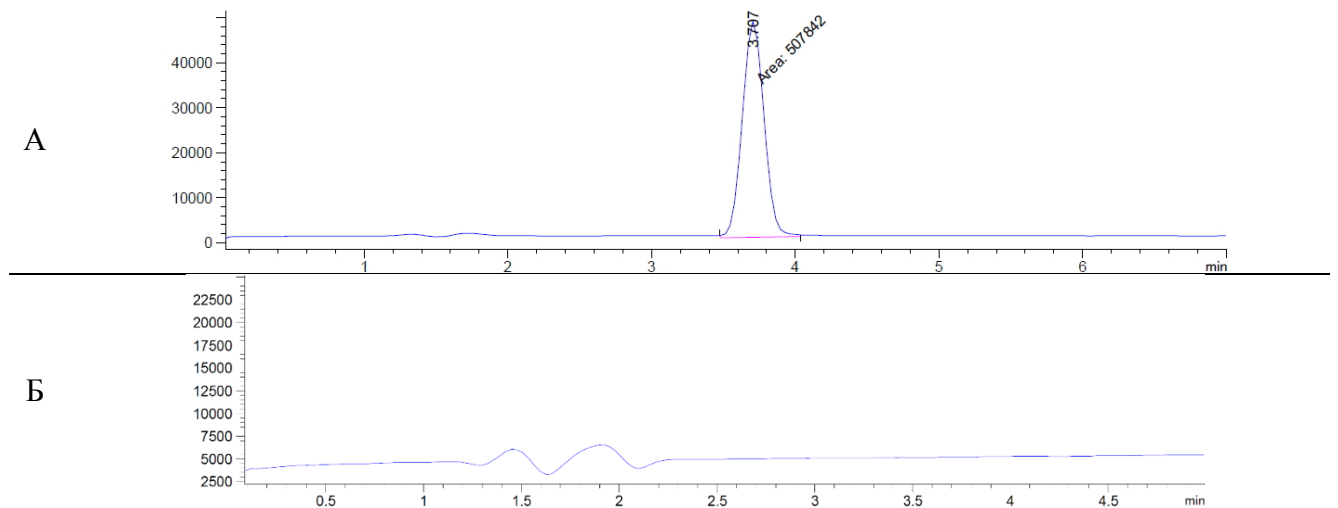


Рисунок 4. Хроматограмма раствора МФК (А) и ФГМФК (Б) при использовании метода ВЭЖХ-МС

Для ГХ-МС-определения микофеноловой кислоты были выбраны следующие условия: *Хроматографическое разделение*: колонка Мега 5-MS (25 м*0,20 мм, 0,33 мкм), скорость потока ПФ (гелий) – 1 мл/мин; температурная программа: начальная температура термостата 100 °С в течение 3 мин., нагрев со скоростью 25°С/мин до 300°С, 300 °С - до конца анализа (19 мин.); температура испарителя - 300°С, объём вводимой пробы – 1 мкл; режим ввода пробы – без деления потока, импульсный. *Масс-спектрометрическое детектирование*: способ ионизации - ионизация электронами; полярность – положительная; режимы детектирования SIM – для МФК - 449 m/z; Scan – 40-550 m/z (при необходимости скрининга). *Пробоподготовка*: к 250 мкл плазмы добавлялось 125 мкл фосфатного буферного раствора рН = 1,8 и 1 мл дихлорметана, полученная смесь перемешивалась на вортексе в течение 30 сек, а затем центрифугировалась 5 мин при 3500 об/мин. Слой органического растворителя отделяли и переносили в стеклянные вials объёмом 2 мл. Экстракт выпаривался на вакуумном концентраторе при 45°С и 3500 об/мин в течение 15 мин. К сухому остатку добавлялось 50 мкл смеси BSTFA и TMCS (99:1, об./об.). Дериватизация проводилась в термостате при 60 °С в течение 20 мин. При данных параметрах пробоподготовки ФГМФК не извлекался из плазмы (рис. 5).

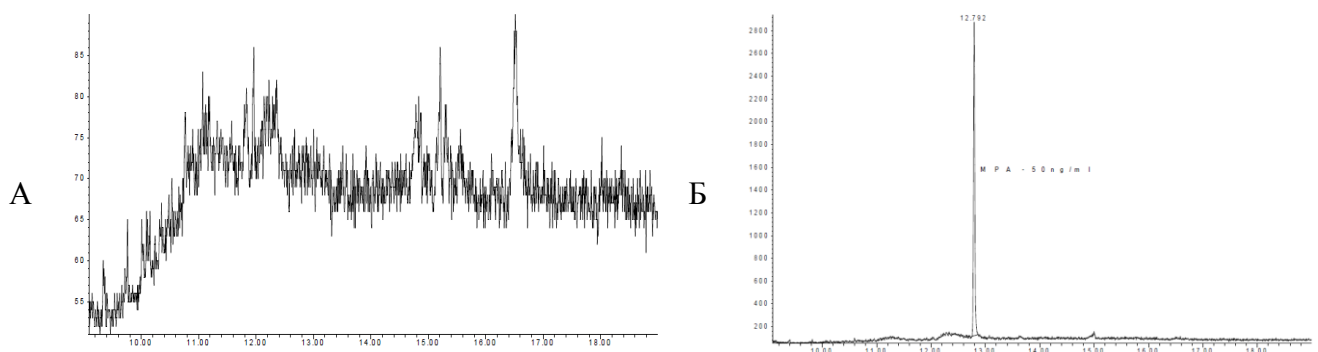


Рисунок 5. Хроматограммы образца плазмы ФГМФК в концентрации 100 мкг/мл (А) и МФК в концентрации 0,05 мкг/мл при использовании ГХ-МС-метода (SIM - 449 m/z)

В ходе перекрёстной валидации методик установлено, что концентрации МФК при определении методом ВЭЖХ-МС находится в диапазоне 95,18-106,93%, при определении ГХ-МС – 94,27-110,26%, относительно результатов ВЭЖХ-МС/МС. Это отвечает критериям приемлемости: погрешность измерений не превышает $\pm 20\%$ для более 67% образцов (табл. 10).

При количественном определении метилдопы в плазме были выбраны следующие условия: *Хроматографическое разделение*: колонка Luna Phenyl-Hexyl (50*3,0 мм, 5 мкм) (колонка №1), колонка Synergi Fusion – RP 80A (150*3,0 мм, 4 мкм) (колонка №2), программа элюирования (табл. 4); подвижная фаза - метанол : вода : водный раствор формиата аммония в концентрации 80 ммоль/мл (рН=3,5) - 40:40:20 (об./об./об.); температура термостата - 40°C; объём вводимой пробы – 8 мкл. *Масс-спектрометрическое детектирование*: способ ионизации – электрораспылительная совместно с химической ионизацией при атмосферном давлении; полярность – положительная; режим MRM – для МД - 212 → 139 m/z, для МД-D₃ - 215 → 169 m/z. *Пробоподготовка*: к 100 мкл плазмы добавляли 400 мкл раствора МД-D₃ в концентрации 0,125 мкг/мл в метаноле, полученную смесь перемешивали на ворткесе в течение 30 сек, подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 3500 об/мин и температуре +4°C.

Таблица 4

Параметры элюирования при определении метилдопы

Время, мин.	Насос 1	Насос 2	Переключение 6-портового крана (рис. 6)	
	Скорость потока мл/мин.	Скорость потока мл/мин.	Время, мин	Положение
0,00	0,4	0,4	0,00	1 > 6
1,25	0,4		0,75	1 > 2
1,26	1,0		1,05	1 > 6
4,25	1,0		8,00	1 > 6
4,26	0,4			
8,00	0,4			

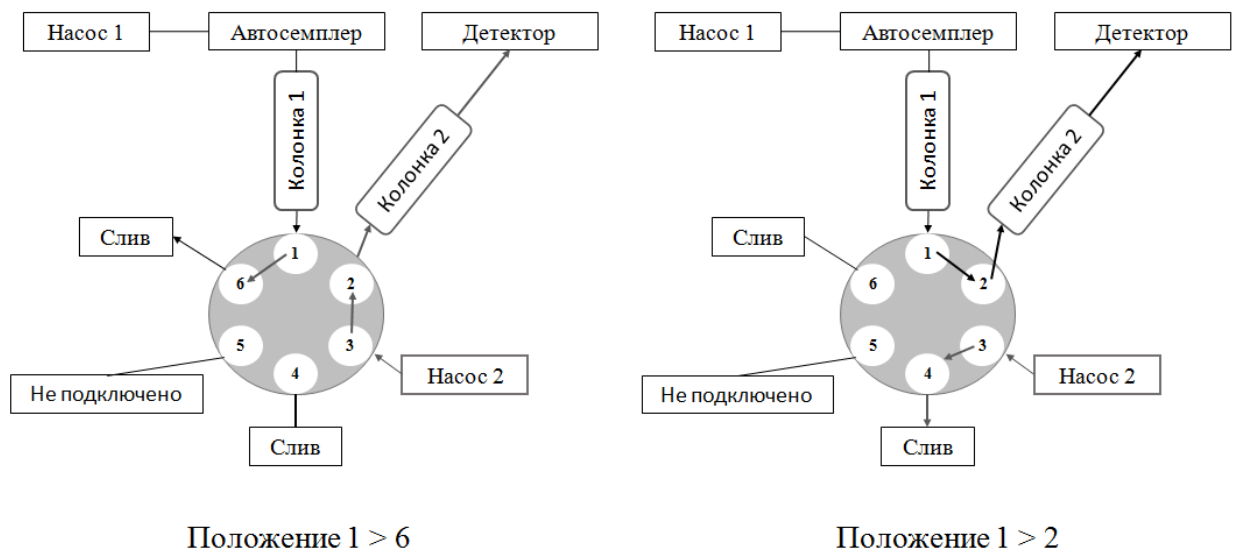


Рисунок 6. Схема переключения 6- портового крана в процессе хроматографического разделения

Таблица 5

Подбор стабилизаторов для предотвращения окисления метилдопы

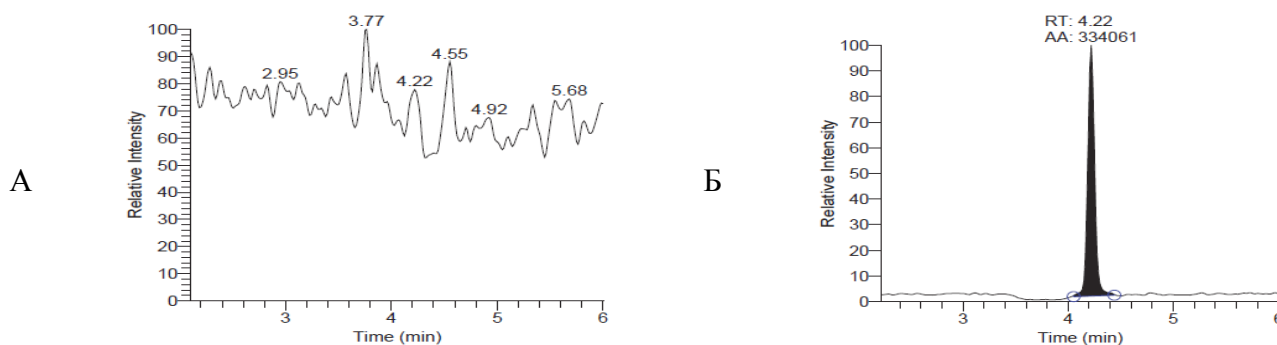
Стабилизатор	Концентрация стабилизатора, %	Краткосрочная стабильность (24 ч. при комнатной температуре), n=2	Стабильность при замораживании / размораживании, n=2	Краткосрочная стабильность (24 ч. при комнатной температуре), n=2	Стабильность при замораживании / размораживании, n=2
		% от начальной концентрации метилдопы			
		К ₃ ЭДТА		Гепаринат лития	
Аскорбиновая кислота	5	88,44	102,30	80,91	99,69
	10	94,91	96,17	78,76	93,21
Смесь аскорбиновой кислоты, натрия гидрокарбоната, натрия сульфита	5% аск. к-ты; 2,4% NaHCO ₃ ; 0,2% Na ₂ SO ₃	89,31	98,24	72,48	95,07
Натрия тиосульфат	5	45,65	101,86	79,41	93,91
	10	31,32	99,81	83,46	97,78
Натрия метабисульфит	5	66,84	102,68	75,79	90,70
	10	75,99	97,25	73,22	88,70
Натрия сульфит	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-

Результаты предварительного изучения стабильности МД в плазме не отвечали критериям приемлемости (табл. 2). При заморозке температуры до -20°C образцы можно хранить только в течение 16 ч. Поэтому требовалось использование раствора стабилизатора. Добавление к плазме растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 5 и 10% и раствора, содержащего смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, из расчёта 0,2 мл раствора антиоксиданта на 1 мл плазмы крови (1:5, об./об.) в комбинации с К₃ЭДТА позволило предотвратить окисление МД в течение 24 ч. хранения при комнатной температуре, а также в течение 3-х циклов замораживания/размораживания (табл. 5). Так как при добавлении перечисленных выше растворов к плазме в объёмном соотношении 1:5 удалось стабилизировать аналит, исследование более концентрированных соотношений (1:2 или 1:1) не проводилось. Для валидации методики и проведения исследования БЭ была выбрана смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита и натрия гидрокарбоната, т.к. её использование позволяло достичь наилучшей чувствительности методики. Изменения условий подготовки проб при этом не потребовалось. Метилдопа в образцах оставалась стабильной в течение 1 мес при температуре -20°C. Снижение температуры хранения образцов до -80°C позволило увеличить срок хранения образцов до 3 мес (табл. 8).

При ВЭЖХ-МС/МС-определении **мебевериновой** и **деметиловой** **мебевериновой** **кислот** были использованы следующие условия: *Хроматографическое разделение*: колонка Luna C₈ Mercury (20*4,0 мм, 5 мкм) (колонка №1), колонка Luna C₈ (150*4,6 мм, 5 мкм) (колонка №2); градиентное элюирование (табл. 6); объём вводимой пробы – 5 мкл; температура – комнатная. *Масс-спектрометрическое детектирование*: способ ионизации – электроспрей с термофокусировкой; полярность – положительная; режим MRM: для МК - 280→121 *m/z*, для

ДМК – 266→107 m/z , МК-D₅ - 285→121 m/z , для ДМК-D₅ - 271→107 m/z . *Пробоподготовка:* к 100 мкл плазмы, добавляли 400 мкл раствора дейтерированных стандартов МК-D₅ и ДМК-D₅ с концентрациями 400,0 нг/мл в метаноле. Полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин.

Выбранные параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования исключают влияние фрагментации ФГДМК в источнике ионов на точность определения ДМК (рис. 7). Результаты предварительного изучения стабильности ДМК отвечали критериям приемлемости (85,0-115,0% от начальной концентрации) с применением К₃ЭДТА и гепарината лития в качестве антикоагулянтов. Обратная конверсия ФГДМК при использовании обоих антикоагулянтов полностью отсутствовала (табл. 7). Для дальнейшего исследования был выбран К₃ЭДТА, т.к. этот антикоагулянт наиболее часто применяется в нашей лаборатории и клиническом центре для биоаналитических исследований других соединений.



266→107 m/z

Рисунок 7. Хроматограмма растворов ФГДМК (А) и ДМК (Б)

Таблица 6

Параметры градиентного элюирования при определении мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот

Растворители: А - ацетонитрил, В - метанол, С – раствор формиата аммония рН=3,5, D – вода												
Время, мин.	Насос 1					Насос 2					Переключение 6-портового крана (рис. 6)	
	Скорость потока, мл/мин.	А, %	В, %	С, %	D, %	Скорость потока, мл/мин.	А, %	В, %	С, %	D, %	Время, мин.	Положение
0,00	0,4	20	50	10	20	0,4	20	50	10	20	0,00	1 > 6
1,00	0,4	20	50	10	20						0,25	1 > 2
1,25	1,2	60	30	10	0						0,75	1 > 6
3,75	1,2	60	30	10	0						6,00	1 > 6
4,00	0,4	20	50	10	20							
6,00	0,4	20	50	10	20							

Таблица 7

Влияние антикоагулянтов на процесс обратной конверсии фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты

	% от хром. пика образца НПКО (n=6)	
	К ₃ ЭДТА	Гепаринат лития
Краткосрочная стабильность (24 ч. хранения при комн. температуре)	0	0
Стабильность после 3 циклов заморозки / разморозки	0	0
Стабильность в депротеинизате образца (24 ч в автосемплере)	0	0

Результаты **валидации** разработанных методик представлены в таблицах 8, 9, 10. Данные методики отвечают установленным критериям приемлемости [Руководство ЕМА по валидации биоаналитических методик, 2010; Руководство ФГБУ НЦЭСМП Том 1, 2013; Руководство ЕАЭС по проведению исследований биоэквивалентности, 2017].

Таблица 8

Результаты оценки стабильности изучаемых соединений в плазме

Параметр		% от номинальной концентрации								
		Микофеноловая кислота		Метаболиты мебеверина				Метилдопа		
				МК		ДМК				
Краткосрочная стабильность (24 ч)	LQC	99,18		107,72		111,41		95,50		
	HQC	99,46		97,81		95,42		89,58		
3 цикла замораживания / размораживания	LQC	105,10		112,34		110,98		104,43		
	HQC	103,55		110,79		114,98		106,95		
Стабильность в авто-семплере	LQC	107,72		109,06		103,44		101,91		
	HQC	108,07		97,44		94,96		101,28		
Долгосрочная стабильность	не выше -20°C	LQC	100,38 (1 мес.)	103,24 (4 мес.)	113,23 (1 мес.)	112,13 (4 мес.)	113,07 (1 мес.)	113,61 (4 мес.)	90,74 (1 мес.)	66,92 (3 мес.)
		HQC	94,79 (1 мес.)	100,86 (4 мес.)	105,45 (1 мес.)	103,56 (4 мес.)	110,33 (1 мес.)	110,06 (4 мес.)	86,20 (1 мес.)	59,57 (3 мес.)
	не выше -80°C	LQC	-	-	-	-	-	-	100,60 (1 мес.)	100,76 (3 мес.)
		HQC	-	-	-	-	-	-	99,12 (1 мес.)	94,08 (3 мес.)

Таблица 9

Результаты валидации разработанных методик

Параметр	Микофеноловая кислота			Исследование мебеверина (ВЭЖХ-МС/МС)		Метилдопа (ВЭЖХ-МС/МС)	
	ВЭЖХ-МС/МС	ВЭЖХ-МС	ГХ-МС	Мебевериновая кислота	Деметилированная мебевериновая кислота		
Селективность	Площади пиков эндогенных соединений в области времен удерживания аналитов не превышали 20% от уровня НПКО, в области времен удерживания внутренних стандартов (кроме ВЭЖХ-МС и ГХ-МС методик определения МФК) не превышала 5% от средней площади пика.						
Калибровочная кривая	диапазон	0,5-30,0 мкг/мл	0,05-30,00 мкг/мл	0,05-30,00 мкг/мл	10-2000 нг/мл	10-2000 нг/мл	0,02-3,00 мкг/мл
	Вид зависимости	$y=ax+b$ (весовой коэффициент $1/x$)	$y=ax$	$y=ax$	$y=ax+b$ (весовой коэффициент $1/x$)	$y=ax+b$ (весовой коэффициент $1/x$)	$y=ax+b$ (весовой коэффициент $1/x$)
Правильность (отн. погр.)	-4,03 ÷ 12,85%,	-14,02 ÷ 11,82%	-14,35% ÷ 6,82%	-14,56% ÷ 14,18%	-1,54% ÷ 18,78%	-5,28% ÷ 7,42%	
Прецизионность (CV)	1,72% ÷ 8,52%	0,36% ÷ 9,82%	1,95% ÷ 5,58%	1,40% ÷ 14,96%	1,18% ÷ 8,58%	0,69% ÷ 3,97%	
Матричные эффекты (CV NMF)	LQC	7,46%	4,70% (MF)	2,28% (MF)	2,24%	2,95%	0,38%
	HQC	6,55%	5,60% (MF)	2,80% (MF)	3,23%	2,89%	1,45%
Эффект разведения	Отн. погр.= 0,16%, CV = 4,46%	Отн. погр.= 3,82%, CV = 6,27%	Отн. погр.= 1,97%; CV = 6,86%	Отн. погр.= 110,58%, CV = 2,51%	Отн. погр.= 12,23% %, CV = 1,56%	Отн. погр.= 0,21%, CV = 1,78%	
Эффект переноса	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует при вводе холостого образца между анализами	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	

Обозначения: НПКО –нижний предел количественного определения, LQC- образцы КК нижнего уровня концентраций; HQC - образцы КК верхнего уровня концентраций; NMF - нормализованный фактор матрицы; MF- фактор матрицы; отн. погр. – среднее значение относительной погрешности

Таблица 10

Перекрёстная валидация методик определения микофеноловой кислоты в плазме крови

	Результаты определения относительно ВЭЖХ-МС/МС-методики, отн. погр, (%)	
	ВЭЖХ-МС-методика	ГХ-МС- методика
Сред. знач.	101,77	101,52
Мин. знач.	91,86	94,27
Макс. знач.	106,93	110,26

Далее в третьей главе сформулированы подходы к разработке методик количественного определения в плазме веществ, имеющих нестабильные функциональные группы и образующих потенциально нестабильные метаболиты. Так, на начальном этапе необходимо осуществить выбор антикоагулянта. При этом нужно провести предварительное изучение краткосрочной стабильности и стабильности при замораживании/размораживании изучаемых веществ, а также обратной конверсии их метаболитов. В случае получения неудовлетворительного результата необходимо выполнить подбор комбинации антикоагулянта и раствора стабилизатора, а также концентрации данного раствора и его соотношения с биологической жидкостью. После этого можно переходить к этапу валидации методики с выбранным антикоагулянтом или комбинацией антикоагулянта и стабилизатора (рис. 8).



Рисунок 8. Подходы к разработке биоаналитической методики для количественного определения в плазме веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы или образующих нестабильные метаболиты

При разработке методики для определения соединений, метаболизирующихся путём глюкуровой конъюгации, необходимо предотвратить влияние разложения данных соединений в источнике ионов на результаты определения аналита во избежание получения ложных результатов измерений. Данные меры также следует применять при биоаналитических исследованиях веществ, образующих такие нестабильные метаболиты, как N-оксиды, S-оксиды, сульфаты, сложные эфиры, лактоны, а также при совместного измерении концентрации сложных эфиров и лактонов с их кислотными формами.

В четвертой главе представлены результаты проведённых фармакокинетических исследований.

Изучение биоэквивалентности таблетированных форм микофенолата натрия проводилось с помощью ВЭЖХ-МС/МС-метода. Всего было проанализировано 1536 образцов. Фармакокинетические кривые МФК (рис. 9) имеют мультипиковый характер, который связан с энтерогепатической рециркуляцией ФГМФК. Фармакокинетический профиль тестируемого препарата характеризуется более высоким уровнем максимальной концентрации МФК и более ранним временем её наступления, тогда как профиль референтного препарата демонстрирует более плавное постепенное нарастание концентрации с достижением меньших уровней C_{max} (табл. 11). В связи тем, что у большинства добровольцев конечный моноэкспоненциальный участок фармакокинетической кривой содержал менее трёх точек со значениями концентрации равными или превышающими НПКО, осуществление процедуры нелинейного регрессионного анализа для вычисления константы элиминации и связанных с ней параметров $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT было невозможно. Отношение средних геометрических параметра AUC_{0-t} составило 101,46%, 90%-ый доверительный интервал - 92,63% – 111,14%, что укладывается в допустимый диапазон границ 80,00 – 125,00%. Отношения средних геометрических значений, а также границы ДИ отношений показателей C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} выходят за установленные пределы, даже с учётом увеличения допустимого диапазона до 77,23 – 129,48%. В связи с этим препарат сравнения «Майфортик» в форме таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой в дозировке 360 мг (Новартис Фарма Штейн АГ, Швейцария) и тестируемый препарат не могут быть признаны биоэквивалентными (табл. 12).

Таблица 11

Фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов микофенолата натрия

Фармакокинетический параметр	Ср. знач. \pm SD	
	T	R
C_{max} , МКГ/мл	16,66 \pm 6,86	12,29 \pm 5,53
AUC_{0-t} , МКГ·ч/мл	22,79 \pm 8,80	22,91 \pm 11,11
C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹	0,7518 \pm 0,2224	0,5591 \pm 0,1812
T_{max} , ч	1,74 \pm 0,64	2,94 \pm 2,36

бозначение: C_{max} - максимальная концентрация в плазме крови; T_{max} - время наступления максимальной концентрации препарата; C_{max}/AUC - относительная скорость всасывания; AUC_{0-t} - площадь под фармакокинетической кривой «концентрация - время» от нулевого значения времени до последнего отбора крови

Таблица 12

Результаты оценки биоэквивалентности тестируемого и референтного препаратов микофенолата натрия

Параметр	Отношение сред. геом.	90% доверительные интервалы		Критерии приемлемости
		L90,%	H90,%	
AUC_{0-t}	101,46	92,63	111,14	80,00 - 125,00%
C_{max}	137,78	117,98	160,90	77,23 – 129,48%
C_{max}/AUC_{0-t}	135,80	121,52	151,77	77,23 – 129,48%

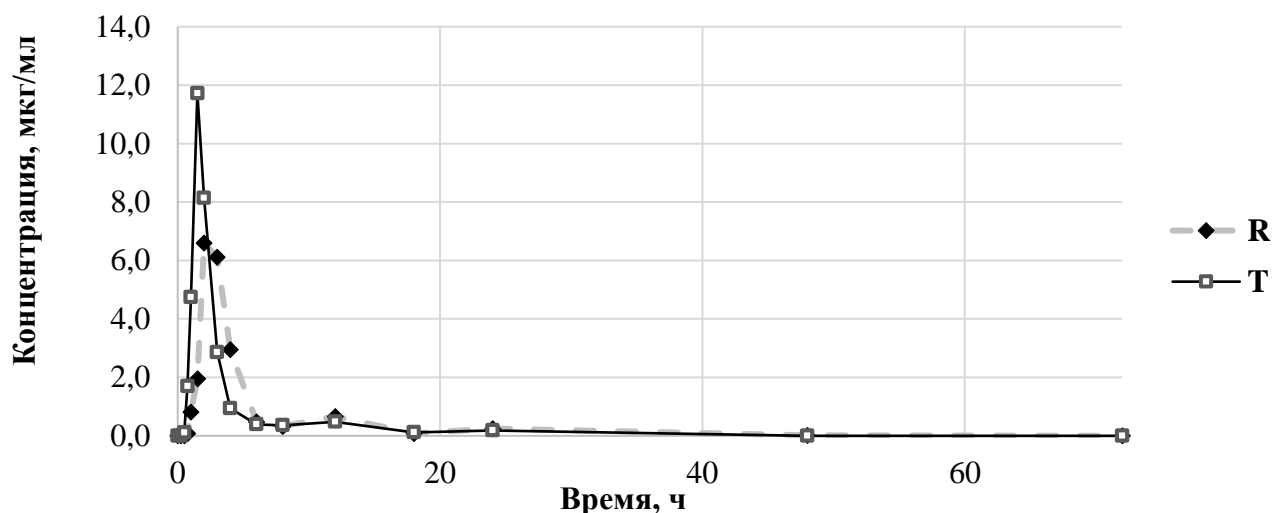


Рисунок 9. Усреднённые фармакокинетические кривые микофеноловой кислоты после приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов

В ходе исследования биоэквивалентности метилдопы было проанализировано проанализировано 864 образца плазмы. Фармакокинетические профили изучаемых препаратов практически совпадают (рис. 10).

Таблица 13

Основные фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов метилдопы

Фармакокинетический параметр	Ср. знач. \pm SD	
	Т	Р
C_{max} , мкг/мл	1,227 \pm 0,601	1,233 \pm 0,419
AUC_{0-t} , мкг*ч/мл	6,219 \pm 3,080	6,385 \pm 2,153
C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹	0,202 \pm 0,038	0,198 \pm 0,037
$AUC_{0-\infty}$, мкг*ч/мл	6,436 \pm 3,181	6,529 \pm 2,187
K_{el} , ч ⁻¹	0,229 \pm 0,110	0,207 \pm 0,107
$T_{1/2}$, ч	3,89 \pm 2,13	4,45 \pm 2,37
MRT, ч	4,97 \pm 0,77	4,98 \pm 0,76
T_{max} , ч	3,18 \pm 1,23	2,90 \pm 0,86

Обозначение: $AUC_{0-\infty}$ - площадь под фармакокинетической кривой от нулевого значения времени до бесконечности; K_{el} - константа элиминации; MRT - среднее время удержания в крови

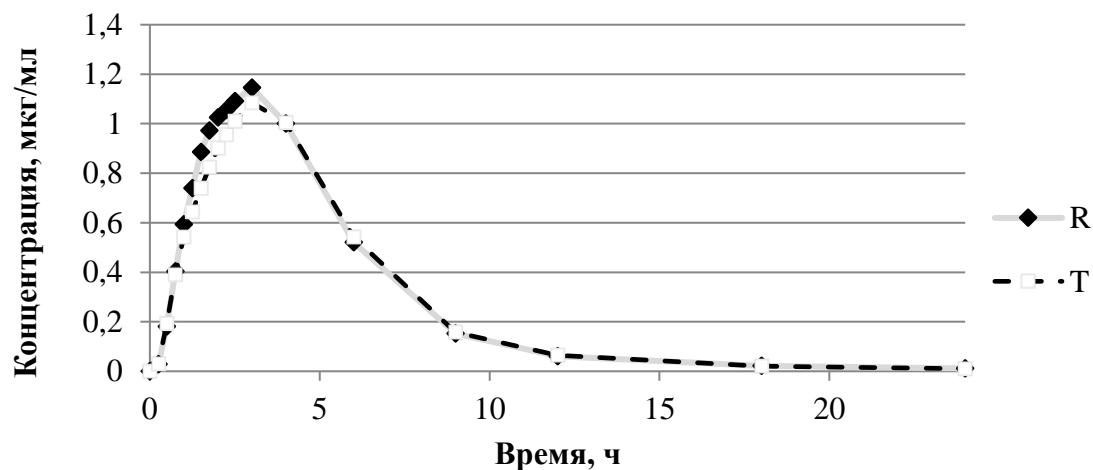


Рисунок 10. Усреднённые фармакокинетические концентрации метилдопы в плазме крови после приёма тестируемого и референтного препаратов

Результаты сравнения фармакокинетических параметров, характеризующих биоэквивалентность тестируемого и референтного препаратов метилдопы

Параметр	Отношение сред. геом., %	90% доверительные интервалы		Критерии приемлемости,%
		L90,%	H90,%	
AUC _{0-t}	92,93	80,69	107,03	80,00-125,00
C _{max}	94,89	80,88	111,34	80,00-125,00
C _{max} /AUC _{0-t}	102,11	93,95	110,98	80,00-125,00

Расчитанные фармакокинетические параметры приведены в табл. 13. Полученные значения отношений геометрического среднего и 90%-доверительные интервалы отношений параметров AUC_{0-t}, C_{max}, C_{max}/AUC_{0-t} укладываются в допустимые пределы – от 80,00% до 125,00% (табл. 14). Таким образом, тестируемый препарат метилдопы и «Допегит» («ЭГИС», Венгрия) являются биоэквивалентными.

При изучении фармакокинетики препарата «Дюспаталин» было проанализировано 360 образцов. Значения таких фармакокинетических параметров, как C_{max}, AUC_{0-t} и AUC_{0-∞} у ДМК значительно выше, чем у МК. Следовательно, ДМК является основным метаболитом мебеверина (табл. 15, рис. 11). Время наступления максимальной концентрации для обоих метаболитов статистически достоверно не различаются (Т-критерий Уилкоксона, p=0,401). Проведённый корреляционный анализ выявил статистически достоверную взаимосвязь между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови добровольцев в промежутке с 0,5 ч до 8,0 ч: значения рангового коэффициента корреляции Спирмена (r_s) превышают критическое значение 0,404 (для выборки n=24 и p=0,05) (табл. 16). При этом в точках 1,0 ч, 1,5 ч, 3,0 ч, 3,5 ч, 4,0 ч, 5,0 ч присутствует сильная корреляция, в точках 0,5 ч, 2,5 ч, 6,0 ч, 8,0 ч – корреляция средней силы. В более поздних точках фармакокинетической кривой концентрация МК в большинстве образцов плазмы ниже НПКО, поэтому достоверная корреляция не была установлена (табл. 16). Расчитанные значения r_s для параметров C_{max}, T_{max}, K_{el}, T_{1/2} превышают критическое значение, что свидетельствует о наличии статистически значимой корреляции (табл. 15). Величина r_s для AUC_{0-t}, AUC_{0-∞}, C_{max}/AUC_{0-t}, MRT ниже критической, однако уровень значимости полученных результатов низкий (p>0,05).

Фармакокинетические параметры метаболитов мебеверина

Фармакокинетический параметр	Ср. знач. ± SD		r _s	p
	МК	ДМК		
C _{max} , нг/мл	62,52± 35,01	291,81± 125,92	0,58	0,003
C _{max} /AUC _{0-t} , ч ⁻¹	0,2238± 0,0598	0,1339± 0,0497	0,32	0,127
AUC _{0-t} , нг*ч/мл	293,94± 151,78	2191,85± 542,94	0,39	0,059
AUC _{0-∞} , нг*ч/мл	365,85± 140,49	2551,74± 546,96	0,01	0,962
K _{el} , ч ⁻¹	0,27584± 0,08426	0,11605± 0,06657	0,42	0,050
T _{1/2} , ч	2,87±1,39	7,52± 3,31	0,42	0,050
MRT, ч	5,82± 1,57	11,2± 4,25	0,26	0,231
T _{max} , ч	3,27±1,03	3,19± 1,48	0,56	0,005

Параметры корреляции концентрации МК и ДМК в точках отбора проб

	Время, ч														
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0	12,0	24,0
r_s	-	0,54	0,73	0,70	0,44	0,48	0,70	0,77	0,76	0,73	0,56	0,51	0,38	0,35	-
p	-	0,006	0,000	0,000	0,030	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,011	0,064	0,097	-

Таким образом, ввиду наличия достоверной положительной корреляции между концентрацией МК и ДМК оценку БЭ лекарственных препаратов мебеверина можно проводить, опираясь на сравнение значений ФК параметров только деметилированной мебевериновой кислоты. Аналогичной точки зрения придерживаются М. Bergenon с соавторами [Bergenon M. et al., 2013], N.E. Moskaleva с соавторами [Moskaleva N.E. et al., 2017], А. Winsemius с соавторами [Winsemius A. et al., 2002].

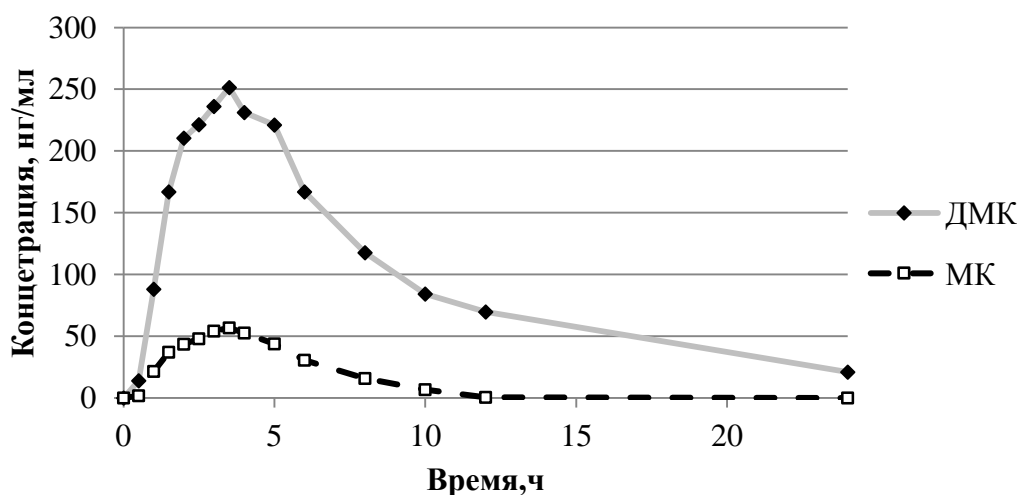


Рисунок 11. Усреднённые фармакокинетические кривые мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот после приёма препарата «Дюспаталин»

В **обсуждении** проводится сравнение полученных результатов фармакокинетических исследований с данными литературы. Наиболее вероятной причиной получения неэквивалентных результатов при изучении БЭ таблетированных форм микофенолата натрия является различие в составе вспомогательных веществ [Хохлов А.Л. и др., 2017, Гильдеева Г.Н., 2017]. Расхождения в значениях ФК параметрах МД в 1,5 раза с результатами Valizadeh, H. С соавторами [Valizadeh, H., 2010] могут быть вызваны нестабильностью молекулы аналита в плазме. Различия в величине C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, полученные в работе Winsemius A. с соавторами [Winsemius A. et al, 2002], вероятно, вызваны недостаточной селективностью использованной ими методики. Основными преимуществами разработанных методик определения микофеноловой кислоты, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот, метилдопы в плазме являются экспрессность и высокая чувствительность [Хохлов А.Л. и др., 2018]. Предложенный подход к разработке биоаналитических методик пригоден для исследований других классов нестабильных соеди-

нений и его использование позволит избежать получения ложных результатов фармакокинетических исследований.

Общие выводы

1. Метилдопа подвергается быстрому окислению и для предотвращения её разложения в плазме необходимо применять K_3 ЭДТА в комбинации с раствором антиоксиданта (смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, объёмное соотношение «раствор стабилизатора/ плазма» - 1:5). При проведении фармакокинетических исследований микофеноловой кислоты и мебеверина применение K_3 ЭДТА позволяет не прибегать к использованию растворов стабилизаторов.
2. Разработанные методики определения в плазме микофеноловой кислоты с помощью ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС, метилдопы методом ВЭЖХ-МС/МС и мебеверинового и деметилированной мебеверинового кислот с применением ВЭЖХ-МС/МС валидированы по показателям селективность, линейность, внутри- и межсерийная прецизионность и правильность, эффект переноса из предыдущей пробы, эффект матрицы, эффект разведения образца, стабильность согласно требованиям руководств ЕМА, ЕАЭС и НЦЭСМП (Т. 1) и пригодны для проведения исследований фармакокинетики и биоэквивалентности.
3. Итоги перекрёстной валидации методик определения микофеноловой кислоты на образцах плазмы, полученных от нелинейных крыс, указывают на высокую степень сходимости результатов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС – определения с результатами ВЭЖХ-МС/МС – определения.
4. В случае нестабильности молекулы вещества, содержащей в структуре фенольные гидроксильные группы, или его глюкуроновых конъюгатов в плазме при подборе антикоагулянта следует осуществить выбор комбинации антикоагулянта и раствора стабилизатора. При этом необходимо установить концентрацию раствора стабилизатора и его соотношение с биологической жидкостью.
5. Тестируемый препарат микофенолата натрия и референтный препарат «Майфортик» не являются биоэквивалентными, ввиду более быстрого высвобождения действующего вещества из изучаемого препарата. Значения геометрических средних отношений параметров C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} и границы их 90%-ых доверительных интервалов не укладываются в допустимый диапазон 77,29-129,48%.
6. Тестируемый препарат метилдопы биоэквивалентен референтному препарату «Допегит». Значения геометрических средних отношений параметров AUC_{0-t} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} изучаемых препаратов и их 90%-ые доверительные интервалы отношений укладываются в диапазон 80,00 – 125,00%.

7. Анализ результатов изучения фармакокинетики препарата «Дюспаталин» показал, между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислоты в плазме крови в период с 0,5 ч по 8,0 ч после приёма ЛП установлена достоверная положительная корреляция. Время наступления максимальной концентрации данных метаболитов в плазме достоверно не различаются. Это позволяет проводить оценку биоэквивалентности препаратов мебеверина, опираясь на сравнение фармакокинетических параметров деметилированной мебевериновой кислоты.

Практические рекомендации

1. При снижении НПКО методики определения микофеноловой кислоты необходимо повторить изучение обратной конверсии её фенольного глюкуронида в процессе хранения для корректировки максимального времени хранения при комнатной температуре.
2. В случае применения для пробоподготовки метода осаждения белков при исследованиях микофеноловой кислоты, метилдопы, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в качестве осадителя следует использовать метанол.
3. Если для количественного определения микофеноловой кислоты в плазме в качестве метода подготовки проб выбрана жидкостно-жидкостная экстракция, то при этом рекомендуется проводить коррекцию pH до 2,0 и в качестве экстрагента использовать дихлорметан.
4. Биоаналитические исследования препаратов метилдопы целесообразно проводить с применением двумерной хроматографии в целях элюирования большей части стабилизатора до попадания в источник ионов. При этом рекомендуется использовать следующие хроматографические колонки: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (50*3,0 мм, 5 мкм) и Phenomenex Synergi Fusion – RP 80A (150*4,6 мм, 4 мкм).
5. Определение мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме рекомендуется выполнять с применением двумерной хроматографии для улучшения соотношения «сигнал/шум» и, как следствие, чувствительности методики. При этом возможно использовать следующие хроматографические колонки: Luna C₈ Mercury (20*4,0 мм, 5 мкм) и Luna C₈ (150*4,6 мм, 5 мкм).

Список опубликованных работ по теме диссертации

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ

1. Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н., Kubeš V., Ryska M., Яичков И.И., Шитова А.М., Шабров В.Н., Мирошников А.Е. Количественное определение микофеноловой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием // Химико-фармацевтический журнал. - 2017. - Т. 51, № 6. – С. 58-61.
2. Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Kubeš V., Шитов Л.Н., Яичков И.И., Шитова А.М. Методика количественного определения метилдопы в плазме крови человека // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2017. – Т.63, № 3. - С. 105-108.
3. Яичков И.И., Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н., Трубников А.А. Способы стабилизации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях при биоаналити-

ческих исследованиях (Обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. - №2. – С. 160-164.

4. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Dzhurko Yu.A., Shitov L.N. Methodical approaches to bioassay of phenolic hydroxylenes contain substances // Medical news of north caucasus. -2017. -V. 12, № 3. - p. 294-299.
5. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Dzhurko Yu.A., Shitov L.N., Shitova A.M. Methodical approaches to bioassay of substances containing unstable functional groups // Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology. – 2018. – V.4, №1. – p. 33-42.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. Джурко Ю.А., Хохлов А.Л., Шитов Л.Н., Яичков И.И., Шитова А.М., Шабров В.Н. Методика количественного определения метилдопы в плазме крови для исследования биоэквивалентности её таблетированных форм // Сборник материалов XXIV национального конгресса «Человек и Лекарство». Тезисы докладов. – М.: Видокс, 2017. – с. 95.
2. Хохлов А.Л., Рыска М., Кукес В.Г., Писачкова М., Печена М., Яворский А.Н., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Ромадоновский Д.П., Шитова А.М., Чудова Н.В., Цызман Л.Г., Лилеева Е.Г., Хохлов А.А., Поздняков Н.О., Мирошников А.Е., Воронина Е.А., Рыбачкова Ю.В., Мануилов Д.М., Зимина Н.В., Яичков И.И. Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведённых лекарственных препаратов: монография. - Фотолайф: Москва - Ярославль – Прага, 2017. - 227 с.
3. Хохлов А.Л., Яичков И.И., Шитова А.М., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н., Мирошников А.Е. Исследование сравнительной фармакокинетики таблетированных форм микофеноловой кислоты // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2017. - №1. - С. 57-62.
4. Хохлов А.Л., Яичков И.И., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Шитова А.М., Хозова Л.А., Мирошников А.Е. Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2017. - №4. - С. 3-8.
5. Хохлов А.Л., Яичков И.И., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н. Подходы к анализу веществ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы, при проведении биоаналитических исследований // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2018. – Т.81., приложение. – с. 263.
6. Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов / А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес, Писачкова М., Печена М., Яворский А.Н., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Ромадоновский Д.П., Шитова А.М., Корсаков М.К., Лилеева Е.Г., Хохлов А.А., Поздняков Н.О., Мирошников А.Е., Воронина Е.А., Рыбачкова Ю.В., Яичков И.И.; под ред. А.Л. Хохлова. – М.: РАН, 2018. – 244 с.
7. Яичков И.И., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н. Основные ошибки в аналитической части исследований биоэквивалентности и фармакокинетики // Медицинская этика. – 2018. – Т.6, № 1. – С. 33-38.
8. Яичков И.И. Разработка методических подходов к анализу веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы и образующих нестабильные метаболиты, при биоаналитических исследованиях // Актуальные вопросы медицинской науки. Сборник тезисов 72-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения почётного профессора ЯГМУ, заслуженного врача РФ Ярыгина Н.Е. – Ярославль: Аверс ПЛЮС, 2018. – с. 300.
9. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Shitov L.N., Dzhurko Y.A., Shitova A.M., Ryska M., Kubeš V., Shabrov V.N., Miroshnikov A.E. Accurate Method of HPLC-Ms/Ms Determination of Mycophenolic Acid in Human Plasma // Journal of Bioequivalence & Bioavailability. – 2016. – V.9, №1. – p. 306-311.
10. Khokhlov A.L., Dzhurko Y.A., Yaichkov I.I., Shitov L.N., Shitova A.M., Khozova L.A., Miroshnikov A.E. The Rapid and Sensitive Hplc-Ms/Ms-Method of Determination of Mebeverine Metabolites in Human Plasma // Mathews Journal of Pharmaceutical Science. – 2017. –V.2, №1. - Режим доступа: mathewsopenaccess.com/PDF/pharmaceutical-science/M_J_Pharm_2_1_010.pdf.

Патенты на изобретение

1. Способ хранения плазмы крови, содержащей лекарственные вещества с нестабильными фенольными гидроксилами: пат. №2639446 Российская федерация / Хохлов А.Л., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Шабров В.Н., Яичков И.И., Самсонов М.Ю., Корнева Е.В., Демчинская А.В. – 23.11.2016.
2. Способ определения концентрации метилдопы в плазме крови человека: пат. №2642593 Российская федерация / Хохлов А.Л., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Шабров В.Н., Яичков И.И., Самсонов М.Ю., Корнева Е.В., Демчинская А.В. – 07.11.2016.
3. Способ определения концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови человека: пат. №2642288 Российская федерация / Хохлов А.Л., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Яичков И.И., Шабров В.Н. – 13.02.2017.

Список сокращений

АГМФК – О-ацилглюкуронид микофеноловая кислоты
 БЭ — биоэквивалентность
 ДМК – деметилированная мебевериновая кислота
 ИМТ — индекс массы тела
 МД — метилдопа
 МК – мебевериновая кислота
 МФК – микофеноловая кислота
 НПКО — нижний предел количественного определения
 ФГДМК – фенольный глюкуронид деметилированной мебевериновой кислоты
 ФГМФК – фенольный глюкуронид микофеноловая кислоты
 ФК — фармакокинетика
 BSTFA - N,O- бис (триметилсилил)-трифторацетамид
 L90– нижняя граница 90%-доверительного интервала
 H90– верхняя граница 90%-доверительного интервала
 R — референтный препарат
 T — тестируемый препарат
 TMCS –триметилхлорсилан