

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Černá

**VÝVOJ UHPLC-MS/MS METODY KE STANOVENÍ NILOTINIBU V KRYSÍM
SÉRU**

**DEVELOPMENT OF A UHPLC-MS/MS METHOD FOR NILOTINIB
DETERMINATION IN RAT SERUM**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2020

Podpis

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout UHPLC-MS/MS metodu ke stanovení nilotinibu v krysím séru. Tato UHPLC-MS/MS metoda byla následně použita ke sledování farmakokinetického průběhu uvolňování účinné látky v modelovém organismu - krysa v rámci projektu zaměřeném na formulační vývoj tablety obsahující nilotinib s pomalejším uvolňováním než doposud.

Optimální nastavení metody bylo následující. Chromatografická kolona Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2,1 mm, 1,7 μ m od firmy Waters. Mobilní fáze se skládala z methanolu a destilované vody, obojí s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí při použití gradientové eluce. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 40 °C, doba analýzy 6,5 minuty a objem nástřiku 2 μ l. Byl sledován MRM přechod pro nilotinib: 530,2 \rightarrow 289,10 (Q1 = -26 V; CE = -31 V; Q3 = -20 V) a pro nilotinib D6: 536,2 \rightarrow 295,15 (Q1 = -26 V; CE = -31 V; Q3 = -14 V). Nastavení iontového zdroje bylo následující: průtok nebulizačního plynu 3 l/min; průtok sušícího plynu 10 l/min; teplota zdroje 300 °C; teplota desolvatační kapiláry 250 °C.

Metoda byla částečně validována. Koeficient determinace 1,0000 ukazuje výbornou linearitu metody. Správnost, vyjádřená relativní chybou, byla do 20 %. Přesnost, vyjádřená pomocí RSD, byla do 9 %. Všechny hodnoty splňují validační kritéria bio-analytické metody.

Klíčová slova: UHPLC-MS/MS, nilotinib, krysí sérum

Abstract

This bachelor thesis aimed to develop a UHPLC-MS/MS method for the determination of nilotinib in rat serum. The developed UHPLC-MS/MS method was used to monitor the pharmacokinetic release of the active substance in a rat model organism in a project focused on the formulation of a tablet containing nilotinib with a slower release than before.

The optimal conditions of the method were as follows. Chromatographic column Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2.1 mm, 1.7 μm from Waters. The mobile phase consisted of methanol and distilled water, both with the addition of 0.1% formic acid using gradient elution. The flow rate of the mobile phase was 0.3 mL/min, the temperature in an autosampler 15 °C, the column temperature 40 °C, the analysis time 6.5 minutes, and the injection volume 2 μl . The MRM transition monitored for nilotinib was: 530.2 \rightarrow 289.10 (Q1 = -26 V; CE = -31 V; Q3 = -20 V) and for nilotinib D6: 536.2 \rightarrow 295.15 (Q1 = -26 V; CE = -31 V; Q3 = -14 V). The setting of the ion source was as follows: nebulizing gas flow 3 L/min; drying gas flow 10 L/min; source temperature 300 °C; desolvation capillary temperature 250 °C.

The method was partially validated. The coefficient of determination 1.0000 shows the excellent linearity of the method. The accuracy, expressed as a relative error, was up to 20 %. The accuracy, expressed by RSD, was up to 9 %. All values meet the validation criteria of the bio-analytical method.

Key words: UHPLC-MS/MS, nilotinib, rat serum

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné vedení a hlavně za trpělivost, rady a připomínky při zpracování této bakalářské práce. Dále chci poděkovat Mgr. Kataríně Molnárové za cenné rady a zaškolení na instrumentu.

Další poděkování patří mé rodině za podporu během studia.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Hmotnostní spektrometrie.....	10
3.1.1 Princip MS.....	10
3.1.2 Ionizační zdroje	10
3.1.3 Hmotnostní analyzátory.....	11
3.1.4 Detektory	12
3.1.5 Trendy v MS.....	12
3.1.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem.....	13
2.2 Vysokoučinná kapalinová spektrometrie	14
2.2.1 Princip HPLC	14
2.2.2 Trendy v LC analýze	15
2.3 Nilotinib	16
2.3.1 Využití	16
2.3.2 Stanovení nilotinibu.....	16
3. Experimentální část	18
3.1 Použité přístroje a chemikálie.....	18
3.2 Příprava zásobních roztoků.....	19
3.3 Kalibrace	19
3.4 Správnost a přesnost metody	20
3.5 Měření reálných vzorků	20
4. Výsledky a diskuse.....	22
4.1 Optimalizace hmotnostního spektrometru	22
4.2 Optimalizace gradientové LC metody	25
4.3 Kalibrační křivka	28
4.4 Správnost a přesnost metody	30
4.5 Reálné vzorky	30
5. Závěr.....	32
6. Literatura	33

Seznam zkratek a symbolů

2D-HPLC	dvourozměrná vysokoúčinná kapalinová chromatografie
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CE	kolizní energie
CI	chemická ionizace
CID	disociace inertním (kolizním) plynem
DMS	iontová mobilitní spektrometrie s rozdílnou pohyblivostí
DT-IMS	iontová mobilitní spektrometrie v driftovém čase
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR-MS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IM-MS, IMS	iontová mobilitní spektrometrie
IT	iontová past
LIT	lineární kvadrupólová iontová past
MALDI	desorpční ionizace laserem za asistence matrice
MF	mobilní fáze
MRM	sledování více reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS-MS, MS/MS, MS ⁿ	tandemová hmotnostní spektrometrie
Ph+ CLM	chronická myeloidní leukémie s přítomností Filadelfského chromozomu
Q	kvadrupól
QC	vzorek pro kontrolu kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
RE	relativní chyba
RP	obrácené fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze

SIM	měření jednoho iontu
SMR	sledování jedné reakce
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokotlaká kapalinová chromatografie

1. Úvod

Nilotinib je léčivá látka, prodávaná pod názvem Tasigna[®]. Byla vyvinuta pro léčbu chronické myeloidní leukémie s přítomností Filadelfského chromozomu (Ph⁺ CLM). Současným trendem v rámci vývoje ve farmaceutickém průmyslu je přicházet na trh s inovativními formulacemi léčivých přípravků, které by umožňovaly používat mnohem nižší dávku farmaceuticky účinné látky a tím ušetřit nemalé peníze při produkci takovéto inovativní lékové formy a zároveň ulevit organismu od negativních účinků spojených s účinnou látkou.

Tato práce vznikla jako součást projektu ve spolupráci farmakologického ústavu, 1. LF UK, VŠCHT, farmaceutické firmy Zentiva a PřF UK, jehož cílem je vytvořit novou formulaci tablety obsahující nilotinib s pomalejším uvolňováním než doposud. V rámci tohoto projektu bylo nutné sledovat farmakokinetický průběh uvolňování účinné látky v modelovém organismu – krysa. Pro tento účel bylo nutné vyvinout citlivou a selektivní UHPLC-MS/MS metodu ke stanovení nilotinibu v krysím séru, čímž se zabývá tato bakalářská práce.

2. Teoretická část

2.1 Hmotnostní spektrometrie

3.1.1 Princip MS

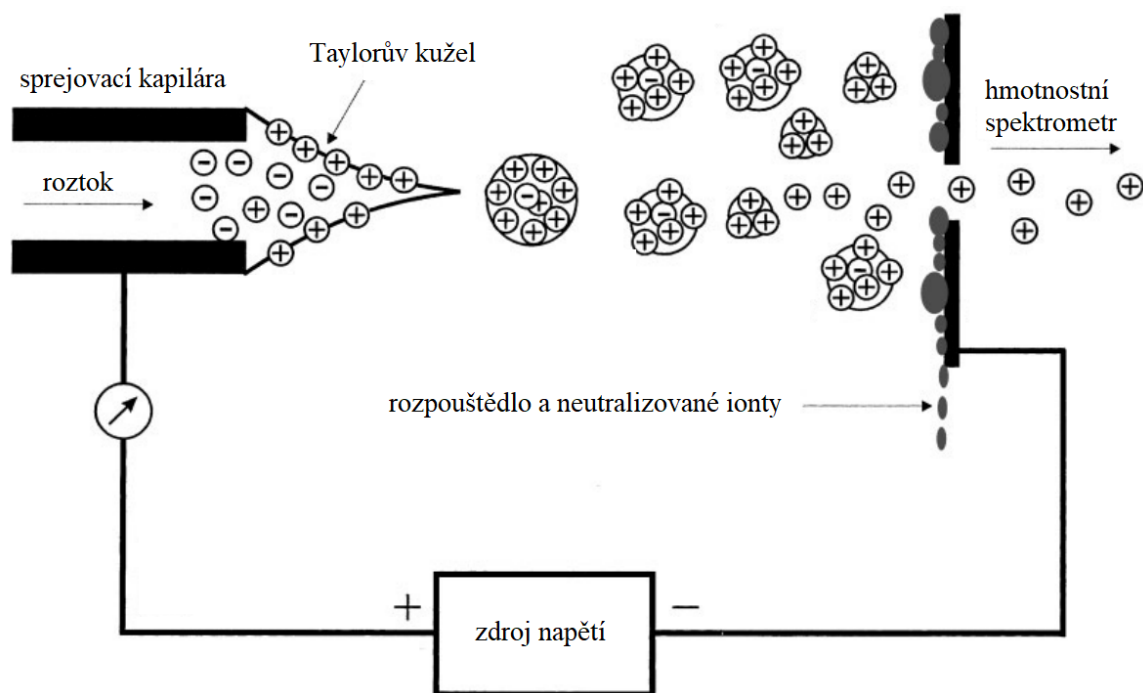
Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry) je fyzikálně-chemická analytická metoda založená na ionizaci molekul, vzniku kladně či záporně nabitých iontů v plynné fázi a jejich následnému dělení ve vakuu dle poměru m/z , tedy hmotnosti a náboje.¹ Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí – iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. MS je využívána pro kvalitativní i kvantitativní analýzu.

3.1.2 Ionizační zdroje

V hmotnostní spektrometrii je možno použít hned několik ionizačních technik, které vedou k tvorbě molekulárních iontů (M^{++} , M^{-}), molekulárních aduktů ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+X]^+$ aj.) nebo fragmentovaných iontů.¹ Jejich výběr závisí hlavně na molekulové hmotnosti a polaritě ionizovaného vzorku.² Ionizační techniky můžeme dělit na měkké a tvrdé, přičemž ionizace může probíhat za atmosférického tlaku nebo vakua.

Mezi tvrdé ionizační techniky patří např. elektronová ionizace (EI, Electron Ionisation), kde zahřátá katoda emituje proud elektronů, které putují k anodě a srážejí se s molekulami analyzovaného vzorku stříknutého do iontového zdroje.³ Tento zdroj je nejčastěji využíván ve spojení s plynovou chromatografií (GC-MS) a je nejvhodnější pro nepolární analyty s nízkou molekulovou hmotností a pro látky těkavé a termostabilní.^{2,3}

Jedna z nejběžněji používaných měkkých ionizačních technik je elektrosprej (ESI, Electrospray Ionization) (Obrázek 1). Eluát je přiveden kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí, a na jejímž hrotu se vytváří tzv. Taylorův kužel. Z něj se uvolňuje sprej nabitých kapiček (aerosol). Rozptyl tohoto spreje omezuje koaxiálně vstříkovaný zmlžující plyn. Kapičky prochází horkým sušícím inertním plynem (dusíkem) a nebo zahřátou kapilárou, kde se odpaří rozpouštědlo a vznikají ionty.^{1,3} Použití elektronové ionizace je výhodné ve spojení s kapalinovou chromatografií (HPLC-MS). Dají se tak dobře analyzovat polární až iontové látky a také proteiny a peptidy.⁴ Při ionizaci vznikají molekulární adukty, často s H, Na, K a případně i s rozpouštědlem, či vícenásobně nabitě ionty.^{3,4}



Obrázek 1: Elektrosprejová ionizace.⁵

Mezi další měkké ionizační techniky patří chemická ionizace (CI, Chemical Ionization), desorpční ionizace laserem za asistence matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization) či fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, Atmospheric Pressure Photoionization).^{1,3,4}

3.1.3 Hmotnostní analyzátoary

Další částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátoar. Zde jsou ionty separovány za vysokého vakua na základě jejich poměru m/z v elektrickém nebo magnetickém poli, či jejich kombinaci.³ To může probíhat na základě několika principů, rozdělit je lze do tří hlavních skupin – pasti, průletové a skenující analyzátoary.¹

Pasti jsou např. iontové pasti (IT, Ion Trap), lineární kvadrupólová iontová past (LIT, Linear Ion Trap) neboli 2D iontová past a orbitrap.³

Mezi průletové patří analyzátoar doby letu (TOF, Time-Of-Flight). Je to jednoduchý pulzní analyzátoar, kde je dělení iontů založeno na různé délce jejich letu k detektoru. Jeho výhodou je využití pro téměř neomezené hodnoty poměru m/z . Využívá se často ve spojení s MALDI.⁶

Do poslední skupiny patří hlavně kvadrupóly, které jsou pravděpodobně nejpoužívanějšími hmotnostními analyzátory. Jsou složeny ze čtyř rovnoběžných kruhových nebo hyperbolických tyčí, na které je vloženo stejnosměrné napětí, vždy na protilehlé kladné či záporné. Zároveň je na všechny vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Dle velikosti napětí bude vždy jen jeden ion s určitým poměrem m/z oscilovat a pohybovat se směrem k detektoru a ostatní budou mít nestabilní trajektorii. Při změně napětí se změní i daný ion, který putuje k detektoru. Toho se dá využít dvěma způsoby – pro proměření všech iontů postupnou změnou napětí a nebo jako měření jednoho iontu při nastavení daného napětí (SIM, single ion monitoring).¹

3.1.4 Detektory

Poslední základní částí hmotnostního spektrometru je detektor. Patří sem např. fotografická deska, Faradayova klec a elektronový násobič. Data z detektoru jsou přenášeny do počítače, kde dojde ke zpracování údajů.³ Výsledkem je hmotnostní spektrum – závislost intenzity či relativní intenzity iontů na m/z .

3.1.5 Trendy v MS

Trendem v MS je používání MS s vysokým rozlišením (HR-MS, High-resolution Mass Spectrometry). Mezi její přednosti patří vysoká citlivost, vysoké rozlišení, vysoká rychlost skenování a využití velkého rozsahu molekulových hmotností. Často se využívá ve spojení s analyzátorem doby letu, sektorovým hmotnostním spektrometrem a Fourierovým transformačním orbitrapem.⁷ HR-MS je využívána v klinické toxikologii⁸ a například ke stanovení škodlivin v potravinách.^{9,10}

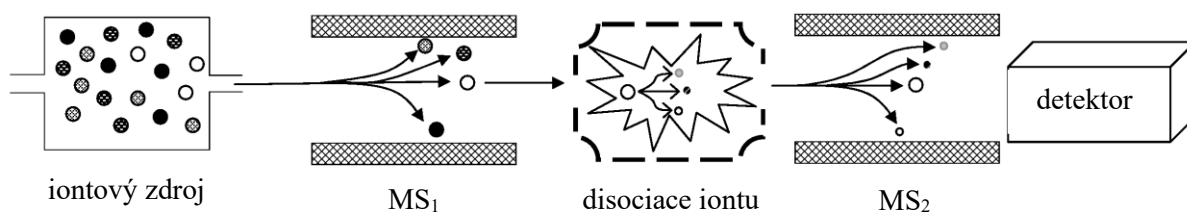
Hybridní hmotnostní spektrometry kombinují výhody různých typů hmotnostních analyzátorů k dosažení vyšší výkonosti MS, jako např. vyšší citlivosti a nižší meze detekce, vyšší rozlišovací schopnosti či zrychlení analýzy. Skládají se alespoň ze dvou selektorů (složkových hmotnostních analyzátorů) různých typů. Těmi mohou být například analyzátor doby letu, iontová past, kvadrupólová iontová past, magnetický sektor, elektrický sektor nebo kvadrupólový hmotnostní filtr.^{11,12}

Iontová mobilitní spektrometrie (IM-MS nebo IMS, Ion Mobility Mass Spectrometry) je analytická metoda, při které dochází k separaci ionizovaných molekul, tedy iontů, nejdříve díky jejich rozdílné pohyblivosti, a poté v hmotnostním analyzátoru na základě jejich poměru m/z . První dělení probíhá v elektrickém poli v driftové trubici proti

toku pufovacího plynu (helia). Ten slouží k zabránění vniknutí nežádoucích molekul do trubice.¹³ Dělení může probíhat několika způsoby – jako IMS v driftovém čase (DT-IMS, Drift-Time), což je nejjednodušší způsob, dále IMS s rozdílnou pohyblivostí (DMS, Differential Mobility) aj.^{14,15} Pro dělení podle m/z je použit hlavně analyzátor doby letu.¹³ Pomocí IM-MS jsme schopni velice účinně rozlišit strukturní izomery, oligomery, polymerní konformery či chirální sloučeniny.¹⁵

3.1.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS-MS) je metoda, při níž izolujeme specifický prekurzorový ion a podrobíme ho disociaci na fragmenty, jejichž spektrum poté měříme (Obrázek 2). Disociace se nejčastěji provádí srážkami s inertním (kolizním) plynem (CID, Collision Induced Dissociation).^{3,16}



Obrázek 2: Tandemová hmotnostní spektrometrie.¹⁶ V prvním hmotnostním analyzátoru MS_1 je vybrán prekurzorový ion, který je následně disociován a fragmenty jsou separovány v druhém hmotnostním analyzátoru MS_2 .

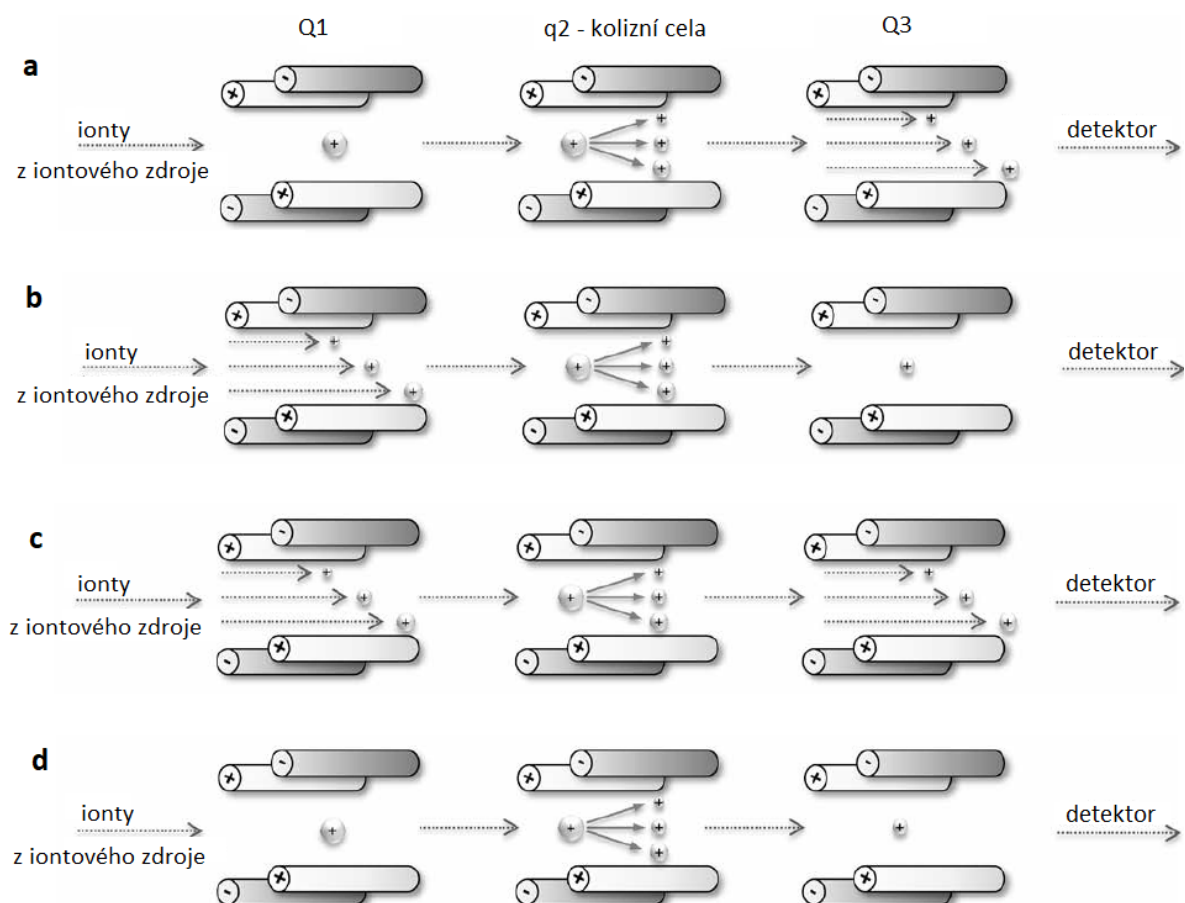
Trojité kvadrupól (QqQ) se skládá ze tří po sobě zapojených kvadrupólových analyzátorů. Druhý quadrupól q_2 neslouží jako analyzátor, nýbrž jako kolizní cela, kde dochází k disociaci prekurzorového iontu, vybraného v Q_1 , pomocí inertního plynu (argon, dusík).¹

Při analýze můžeme dostat různé skeny (Obrázek 3). První možností je sken produktových iontů. V prvním analyzátoru Q_1 je vybrán prekurzorový ion s určitou hodnotou m/z , který je následně disociován v q_2 a produktové ionty jsou děleny v analyzátoru Q_3 a detekovány.¹

Sken prekurzorových iontů funguje opačně. Q_1 dělí ionty a všechny propouští do kolizní cely, zatímco Q_2 poté propouští do detektoru jen produktový ion s určitou m/z . Využívá se při sledování jedné funkční skupiny u více látek.¹

Při skenu neutrální ztráty jsou sledovány ionty, které při disociaci ztratí neutrální fragment o stejné hmotnosti. Využívá se například při derivatizaci.¹

Poslední možností je sledování rozpadu iontu (SRM, Selected Reaction Monitoring). V Q1 je vybrán jeden prekurzorový ion, který je následně fragmentován. V Q2 je následně vybrán nejintenzivnější produktový ion, který putuje k detektoru. Tomuto měření většinou předchází použití skenu produktových iontů, kdy je vybrán nejintenzivnější přechod.¹



Obrázek 3: Skeny při použití trojitého kvadrupólu.¹ Sken produktových iontů (a), prekurzorových iontů (b), neutrální ztráty (c) a sledování rozpadu iontu (d).

2.2 Vysokoučinná kapalinová spektrometrie

2.2.1 Princip HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) je analytická separační metoda, využívaná pro rychlou separaci látek a jejich následnou identifikaci či kvantifikaci. Principem je rozdílná distribuce látek mezi

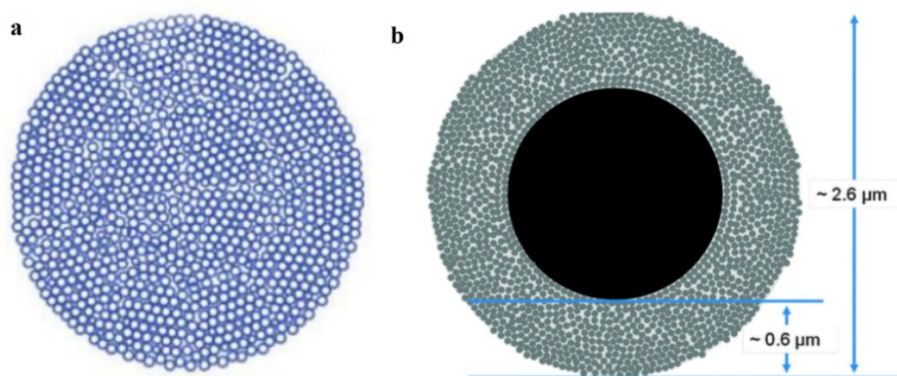
kapalnou mobilní fází (MF) a stacionární fází (SF), přičemž MF je protlačována pomocí zvýšeného tlaku.¹⁷ Při separaci může být využito několika mechanismů – adsorpce, iontová výměna, dělení dle velikosti molekul a dělení mezi dvě nemísitelné kapaliny.¹⁸

Nejrozšířenější je použití adsorpční chromatografie, která může probíhat na normálních fázích, kdy je MF nepolární a SF polární, nebo na obrácených fázích (RP, Reversed Phase), kdy je MF polární a SF nepolární. Jako polární SF se nejčastěji používá silikagel a jako nepolární kovalentně vázané uhlovodíky (C8 nebo C18) na silikagelu.¹⁸ Mezi základní instrumentaci HPLC patří zásobníky MF, odplyňovač, směšovač, čerpadlo, automatický dávkovač vzorků, dávkovací ventil, kolona, termostat a detektor.^{17,19}

2.2.2 Trendy v LC analýze

Jedním z trendů LC analýzy je dvourozměrná HPLC (2D-HPLC). Jde o postupné zapojení alespoň dvou separačních systémů (kolon) s cílem výrazně zvýšit počet separovaných analytů během analýzy. Provedena může být off-line^{20,21}, kdy se frakce z prvního systému přesunou do druhého po skončení první separace, nebo on-line, při níž se separované látky rovnou převádí do druhého systému pomocí vícecestného ventilu. On-line analýza se používá v režimu „stop and go“, kdy se na druhou kolonu dostávají jen úseky z první kolony, nebo jako komprehensivní HPLC, zde putuje vše z první kolony na druhou.²⁰

Za další z trendů by se daly považovat core-shell částice (Obrázek 4). Mají pevné jádro a porézní povrch tvořený stacionární fází. Využívají se jako náplň kolon kvůli vysoce účinnému dělení s rychlým průtokem a nízkým protitlakem. Díky malému objemu pórů a jejich malé hloubce se snižuje vířivá difúze v MF a odpor proti převodu hmoty v MF a SF, což má za následek zužování píků analytů a zkrácení doby analýzy.²²



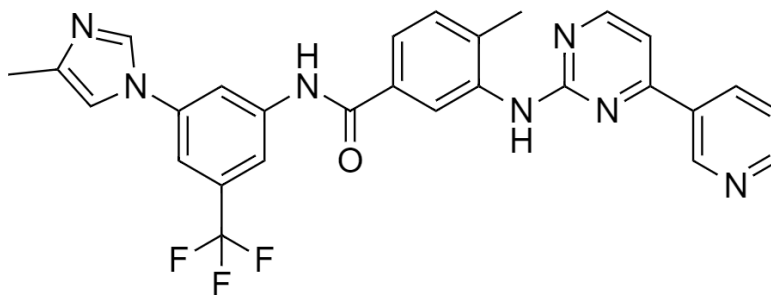
Obrázek 4: Částice stacionární fáze.²³ Plně porézní částice (a) a core-shell částice (b).

Ultra-vysokotlaká kapalinová chromatografie (UHPLC, Ultra High Pressure Liquid Chromatography) je obdoba HPLC, při které se používají částice menší než 2 μm a vyšší provozní tlak, u novějších systémů až 1200-1400 barů. Výhodou je tedy zrychlení analýzy, vyšší účinnost separace a snížení spotřeby rozpouštědel.²⁴

2.3 Nilotinib

2.3.1 Využití

Nilotinib (Obrázek 5), derivát aminopyrimidinu, je léčivo vyvinuté pro léčbu chronické myeloidní leukémie s přítomností Filadelfského chromozomu (Ph⁺ CLM). Používá se při toleranci či rezistenci na předchozí léčbu imatinibem a v chronické nebo akcelerační fázi nemoci. Přípravek je prodáván pod názvem Tasigna[®].²⁵



Obrázek 5: Nilotinib.

Filadelfský chromozom, vznikající translokací mezi chromozomy 22 a 9, nese gen BCR-ABL. Ten má za následek zvýšenou proliferaci buněk. Nilotinib funguje jako inhibitor tyrosin kinázové aktivity vznikajícího proteinu BCR-ABL.²⁶ Léčba nilotinibem může mít i vedlejší účinky, nejčastěji to jsou vyrážka, nevolnost, svědění, bolest hlavy, svalů, kloubů nebo únava.^{25,27} V současné době je studováno využití nilotinibu i pro jiné druhy rakoviny.²⁸

2.3.2 Stanovení nilotinibu

Nilotinib je nejčastěji stanovován v lécích^{29,30}, lidské krevní plasmě³¹, popřípadě plasmě krysi³² či myši³³ a v periferních krevních mononukleárních buňkách³⁴. Jako analytická metoda je nejčastěji využívána HPLC s různými možnostmi detekce a mobilními fázemi. Používána je například MS/MS detekce³², fluorimetrická detekce³⁵, UV detekce²⁹. Dalšími metodami může být UHPLC-MS/MS³¹ nebo hydrofilní interakční

kapalinová chromatografie (HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) s MS/MS detekcí³³.

Stanovení nilotinibu těmito metodami probíhá nejčastěji na stacionární fázi C18 v reverzním módu. Další možností je použít např. fenylovou kolonu.³¹ Při HILIC chromatografii je pak použita kolona HILIC se sérií slabě kyselých, neutrálních a bazických SF.³³

Jako mobilní fáze se používají různé směsi, jejichž součástí je obvykle jako organická složka acetonitril či methanol. Jsou to například následující směsi:

- 40 % (H₂O:methanol:triethylamin = 72,5:25:2,5), 20 % methanolu, 40 % acetonitrilu³⁶,
- 54,5 % 10mM dihydrogenfosforečnanu draselného, 45,5 % acetonitrilu²⁹,
- 40 % vodné fáze (0,15% kyselina mravenčí a 0,05% octan amonný), 60 % acetonitrilu³¹,
- 65 % 4mM mravenčanu amonného (pH 3,2), 35 % acetonitrilu³⁷.

Při měřeních se využívá jak isokratické, tak gradientové eluce.

3. Experimentální část

3.1 Použité přístroje a chemikálie

Chemikálie:

- Nilotinib, čistota $\geq 99,0\%$, Zentiva Group a.s. (Praha, Česká republika)
- Nilotinob D6, čistota $\geq 90,0\%$, Clearsynth[®] (Bombaj, Indie)
- Acetonitril, čistota $\geq 99,9\%$, LC-MS Chromasolv[™], Honeywell Riedel-de-Haën[™] (Seelze, Německo)
- Methanol, čistota $\geq 99,9\%$, LC-MS Chromasolv[™], Honeywell Riedel-de-Haën[™] (Seelze, Německo)
- Destilovaná voda, Milli-Q plus, Millipore (Bedford, USA)
- Kyselina mravenčí, čistota LC-MS, Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, USA)
- Krysí sérum, Farmakologický ústav 1. lékařské fakulty, Univerzita Karlova (Praha, Česká republika)
- Vzorok – krysí sérum, odebírané v různých intervalech od podání nilotinibu, Farmakologický ústav 1. lékařské fakulty, Univerzita Karlova (Praha, Česká republika)

Kolony:

- Kinetex 100x2,1 mm, 1,7 μm , EVO C18, Phenomenex[®] (Torrance, USA)
- Acquity UPLC HSS C18 SB 100x2,1 mm, 1,7 μm , Waters (Milford, USA)
- Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2,1 mm, 1,7 μm , Waters (Milford, USA)

Přístroje:

- Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr, LCMS-8045, Shimadzu (Kjóto, Japonsko)
- Analytické váhy, Santorius Entris[®] (Gottingen, Německo)
- Automatické pipety, Socorex (Ecublens, Švýcarsko)
- Ultrazvuk, Elmasonic S 15 H, Elma (Singen, Německo)
- Homogenizátor CHS Vortex, Chromservis s.r.o. (Praha, Česká republika)
- Mini centrifuga, ROTILABO[®] Gusto[™], Carl Roth (Karlsruhe, Německo)

Další:

- Excel
- LabSolutions, Shimadzu (Kjóto, Japonsko)

3.2 Příprava zásobních roztoků

Byl připraven zásobní roztok nilotinibu o koncentraci 0,2 mg/ml a značeného nilotinibu D6 o koncentraci 1 mg/ml. Navážená množství byla za pomoci ultrazvuku rozpuštěna v příslušném objemu methanolu.

3.3 Kalibrace

Bylo připraveno sedm kalibračních roztoků dle tabulky 1. Uvedené zásobní roztoky nilotinibu a nilotinibu D6 byly připraveny následovně.

Zásobní roztoky nilotinibu použité při kalibraci byly připraveny z hlavního zásobního roztoku o koncentraci 0,2 mg/ml. Ten byl nejprve zředěn 40× methanolem a následně 10× acetonitrilem na koncentraci 500 ng/ml (1. zásobní roztok). Tento zásobní roztok byl poté zředěn 20× acetonitrilem na koncentraci 25 ng/ml (2. zásobní roztok) a ten nakonec 5× acetonitrilem na koncentraci 5 ng/ml (3. zásobní roztok).

Zásobní roztok nilotinibu D6 byl připraven z hlavního zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml. Ten byl zředěn 50× methanolem, následně 50× acetonitrilem a ten ještě 4× acetonitrilem na výslednou koncentraci 100 ng/ml.

Tabulka 1: Složení kalibračních roztoků.

č. roztoku	c celková ng/ml	c zásob. roz. nilotinibu ng/ml	V zásob. roz. nilotinibu μl	V zásob. roz. nilotinibu D6 μl	V séra μl	V acetonitrilu μl	V celkový μl
1	0,156	5	5	40	40	75	160
2	0,313	5	10	40	40	70	160
3	0,625	25	4	40	40	76	160
4	2,500	25	16	40	40	64	160
5	12,500	25	80	40	40	0	160
6	50,000	500	16	40	40	64	160
7	125,000	500	40	40	40	40	160

Byly připraveny dvě kalibrace. První kalibrace byla provedena bez séra, kdy sérum v tabulce 1 bylo nahrazeno destilovanou vodou. Tyto roztoky byly zamíchány na vortexu a následně měřeny. Poté byla provedena kalibrace se sérem. Připravené roztoky byly zamíchány na vortexu, stočeny na centrifuze (6 min, 12500 RPM) a supernatant byl použit k měření. Každý kalibrační roztok byl měřen třikrát. Mezi jednotlivé koncentrace bylo zařazeno měření blanku (roztok acetonitrilu a deionizované vody 3:1).

3.4 Správnost a přesnost metody

Pro stanovení přesnosti a správnosti metody byly připraveny roztoky se sérem o koncentracích nilotinibu 0,313, 2,5 a 50 ng/ml dle tabulky 1. Každá koncentrace byla připravena třikrát (vzorky A, B, C). Roztoky byly zamíchány na vortexu, stočeny na centrifuze (6 min, 12500 RPM) a supernatant byl využit k měření. Každý připravený roztok byl měřen třikrát a mezi různé koncentrace byl vložen blank (roztok acetonitrilu a deionizované vody 3:1).

Správnost byla vyjádřena jako relativní chyba (RE), která byla počítána dle vzorce:

$$RE = \frac{c(\text{naměřená}) - c(\text{očekávaná})}{c(\text{očekávaná})} \times 100 \quad (1)$$

Pro zjištění přesnosti byla nejdříve počítána směrodatná odchylka (SD), dána vztahem:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

kde x_i jsou jednotlivá měření v souboru hodnot, \bar{x} aritmetický průměr souboru hodnot, n počet jednotlivých měření v souboru hodnot.

Přesnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD), která byla vypočítána dle vzorce:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

3.5 Měření reálných vzorků

Pro přípravu reálných vzorků byl používán roztok nilotinibu D6 o koncentraci 33,4 ng/ml (5× zředěný zásobní roztok nilotinibu D6 methanolem, následně bylo pipetováno 8,35 μ l tohoto roztoku a doplněno acetonitrilem na 50 ml).

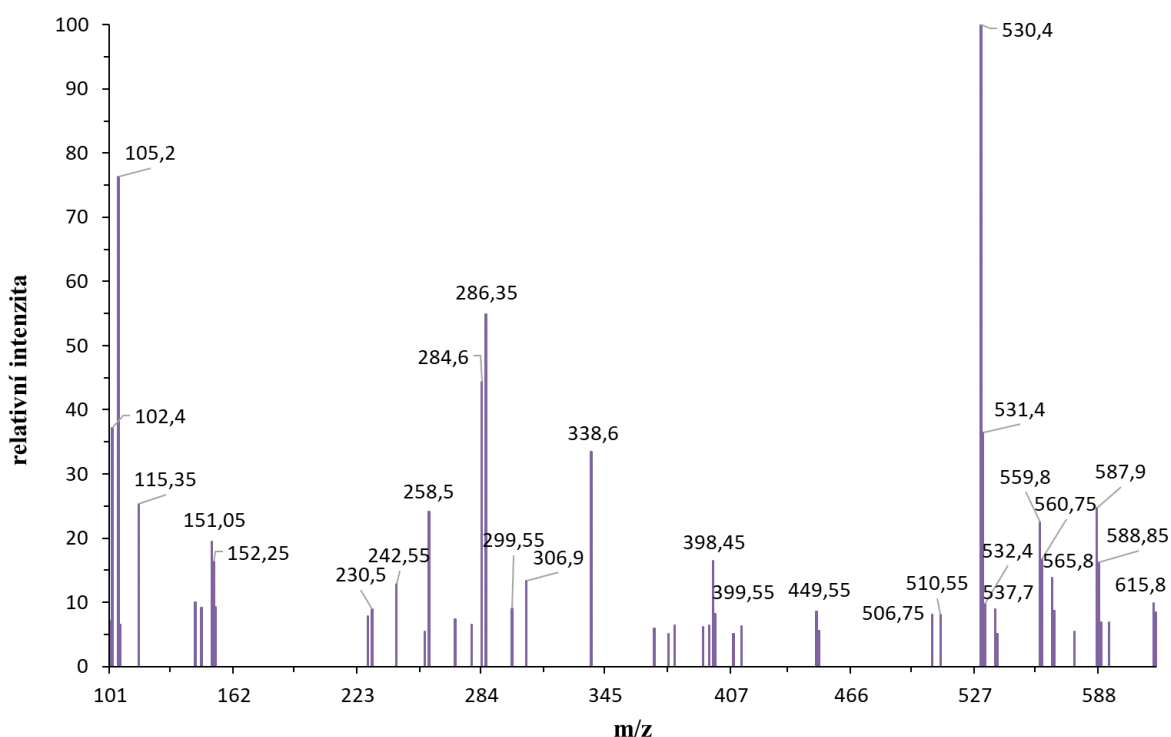
Reálný vzorek byl připraven smícháním 60 μ l tohoto roztoku nilotinibu D6 a 20 μ l vzorku séra krysy, odebíraných v různých časech. Tím došlo k vysrážení sérových proteinů. Následně byl vzorek zamíchán na vortexu, stočen na centrifuze (6 min, 12500 RPM) a k měření využit supernatant.

Vždy byla měřena celá sada vzorků odběrů séra z jedné krysy a poté následoval QC vzorek (použit jeden z kalibračních roztoků, vložen pro kontrolu) a blank (roztok acetonitrilu a deionizované vody 3:1). Změřeny byly dva profily krysy, tedy 2 sady vzorků.

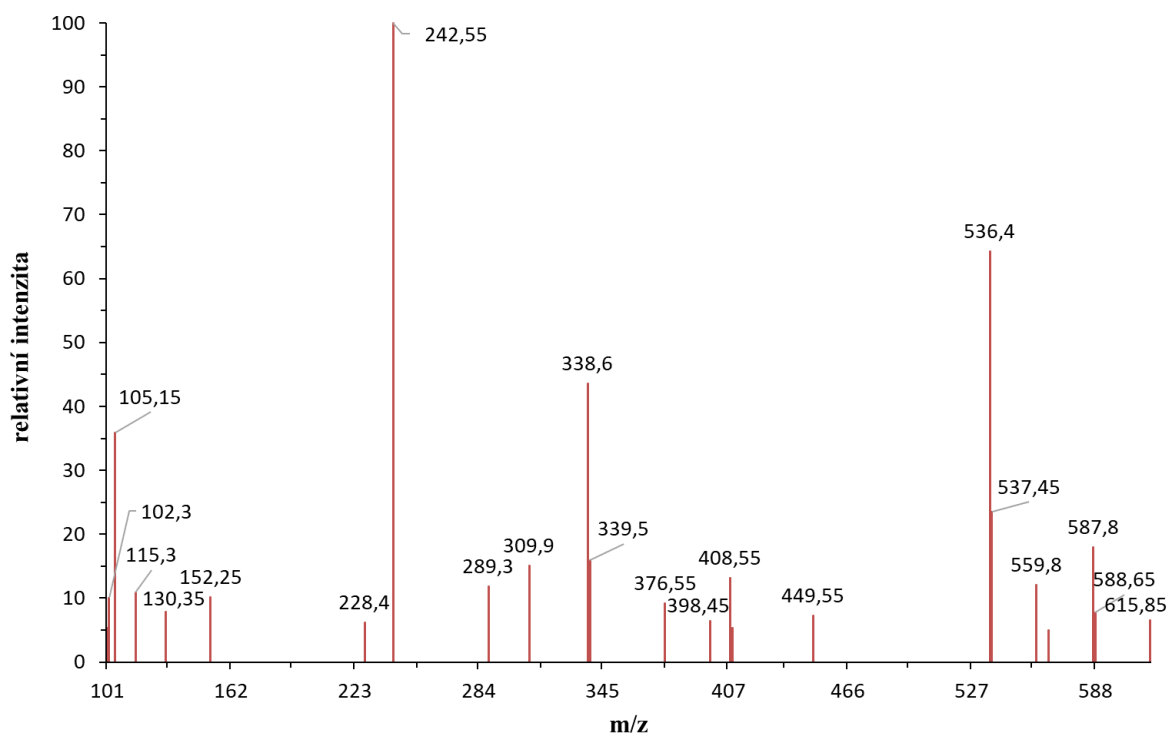
4. Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace hmotnostního spektrometru

Měření probíhalo na hmotnostním spektrometru za použití elektrosprejové ionizace v pozitivním režimu. Analyty byly dávkovány do proudu mobilní fáze bez kolony. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu (70 %) a destilované vody (30 %). Podmínky při měření byly následující: průtok 0,2 ml/min, teplota na dávkovači 15 °C, doba analýzy 1 minuta a objem nástřiku 2 μ l. Nejdříve bylo změřeno celé hmotnostní spektrum nilotinibu (Graf 1) a nilotinibu D6 (Graf 2) o koncentracích 0,1 μ g/ml.



Graf 1: Hmotnostní spektrum nilotinibu.



Graf 2: Hmotnostní spektrum nilotinibu D6.

Poté byly z grafů 1 a 2 vybrány prekurzorové ionty odpovídající $[M+H]^+$ iontům daných analytů. Pro nilotinib se jednalo o ion s m/z 530,4 a pro nilotinib D6 ion s m/z 536,4.

Tyto ionty byly následně podrobeny automatické optimalizaci hmotnostního spektrometru za účelem nalezení optimálního nastavení iontové optiky a vhodných produktových iontů. Manuálně byly zadány prekurzorové ionty a rozmezí napětí kolizní energie -80 až -5 V. Hmotnostní spektrum produktových iontů nilotinibu vzniklých fragmentací m/z 530,4 při hodnotě kolizní energie -30 V je znázorněno na grafu 3. Hmotnostní spektrum produktových iontů nilotinibu D6 vzniklých fragmentací m/z 536,4 při hodnotě kolizní energie -30 V je znázorněno na grafu 4. Z automatické optimalizace byly získány tři MRM přechody pro každý analyt s jejich optimálním nastavením iontové optiky. Výsledky z automatické optimalizace MRM přechodů pro nilotinib jsou uvedeny v tabulce 2 a pro nilotinib D6 v tabulce 3. Pro následující měření byl používán přechod $530,2 \rightarrow 289,10$ pro nilotinib a přechod $536,2 \rightarrow 295,15$ pro nilotinib D6 vzhledem k jejich nejvýhodnějšímu poměru signál/šum.

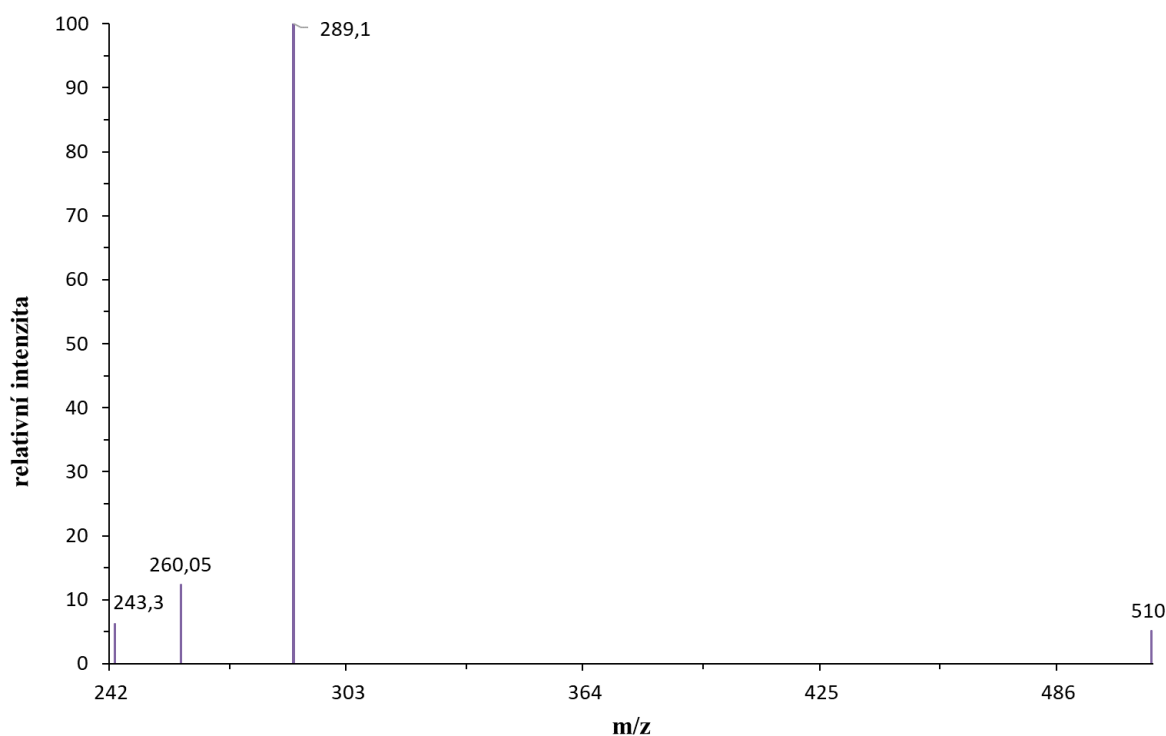
Iontový zdroj byl nastaven tak, aby došlo k odsušení mobilní fáze: Průtok nebulizačního plynu: 3 l/min; průtok sušícího plynu: 10 l/min; teplota zdroje: 300 °C; teplota desolvatační kapiláry: 250 °C.

Tabulka 2: Optimální energie pro hlavní přechody nilotinibu.

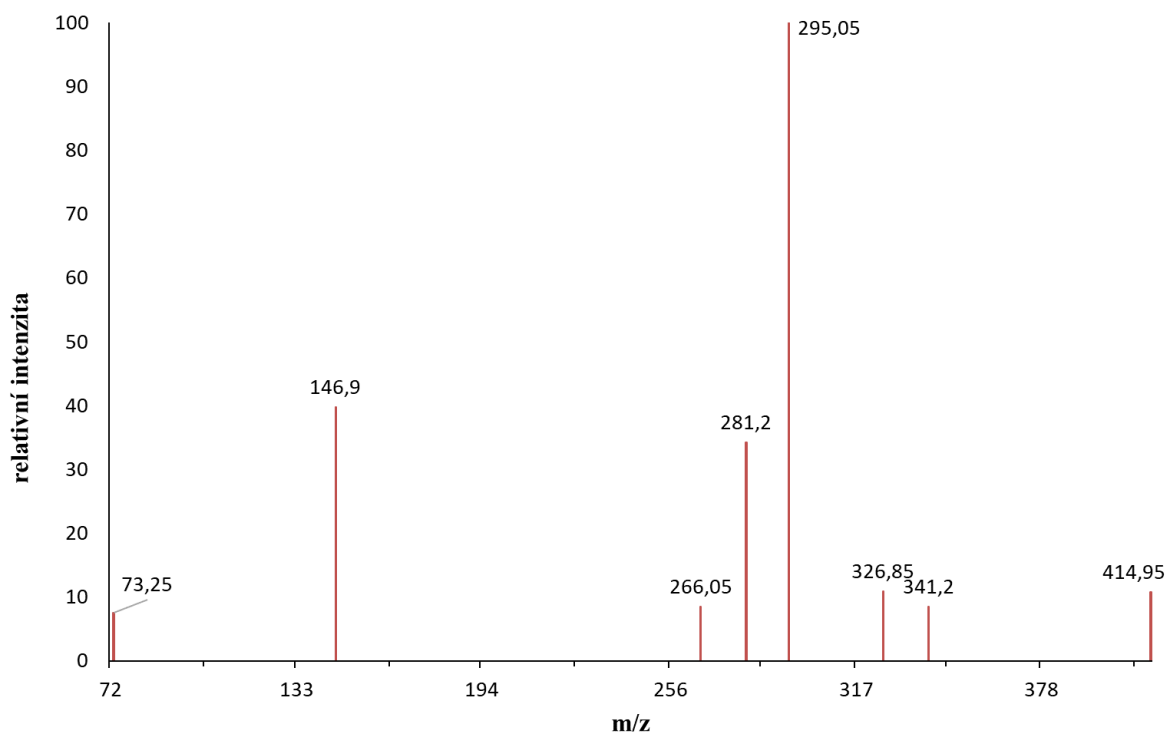
prekurzor m/z	produkt m/z	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
530,2	289,10	-26,0	-31,0	-20,0
530,2	259,10	-26,0	-56,0	-26,0
530,2	261,10	-20,0	-45,0	-27,0

Tabulka 3: Optimální energie pro hlavní přechody nilotinibu D6.

prekurzor m/z	produkt m/z	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
536,2	281,00	-26,0	-24,0	-19,0
536,2	295,15	-26,0	-31,0	-14,0
536,2	264,10	-20,0	-65,0	-26,0



Graf 3: Sken produktových iontů při zadání prekurzorového iontu s m/z 530,4 za použití kolizní energie -30 V, nilotinib.



Graf 4: Sken produktových iontů při zadání prekurzorového iontu s m/z 536,4 za použití kolizní energie -30 V, nilotinib D6.

4.2 Optimalizace gradientové LC metody

První byla zkoušena kolona č. 1 Kinetex 100x2,1 mm, 1,7 μm , EVO C18 a různé gradientové eluce s mobilní fází složenou z acetonitrilu a destilované vody s 0,1% kyselinou mravenčí. Chromatografický pík byl pokaždé velmi rozmytý a nesymetrický, a proto jsme použili jinou chromatografickou kolonu.

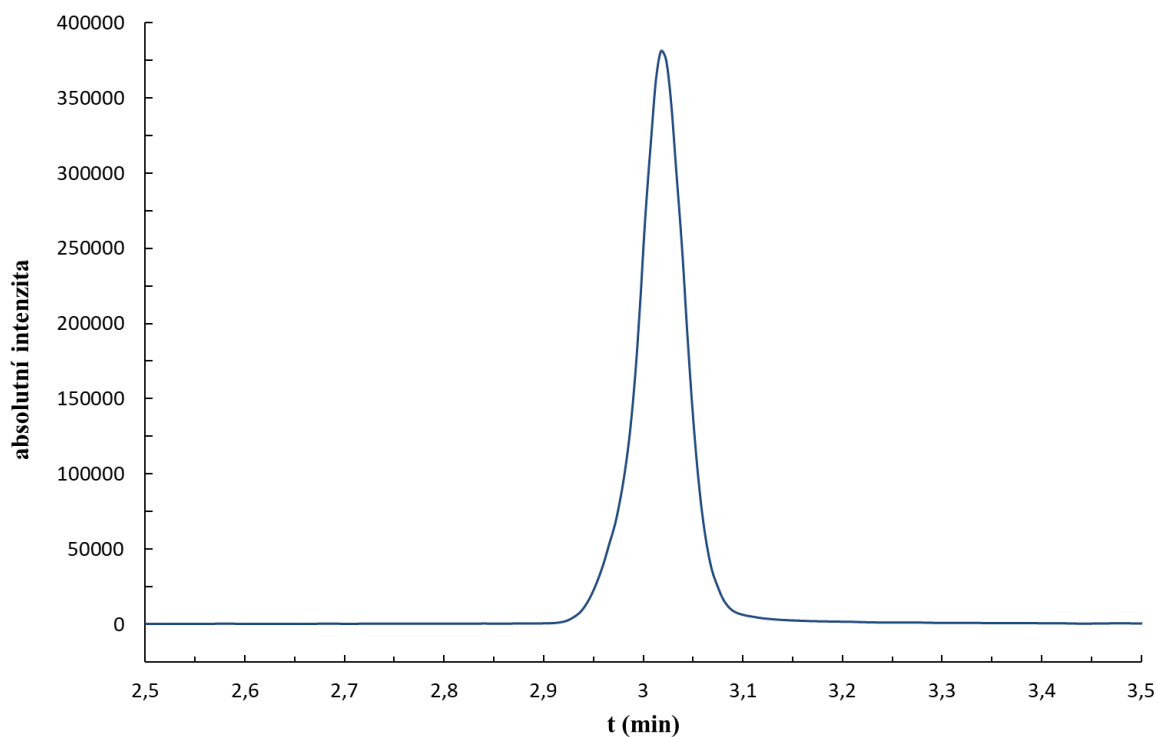
Jako kolona č. 2 byla použita Acquity UPLC HSS C18 SB 100x2,1 mm, 1,7 μm od firmy Waters. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a destilované vody, obojí s přísávkem 0,1% kyseliny mravenčí. Byly nastaveny následující podmínky měření: průtok 0,3 ml/min, teplota na dávkovači 15 $^{\circ}\text{C}$, teplota kolony 40 $^{\circ}\text{C}$, doba analýzy 6,5 minuty a objem nástřiku 1 μl . Byla vyzkoušena řada gradientových programů. Optimální gradientový program z pohledu retence nilotinibu a tvaru chromatografického píku je uveden v tabulce 4. Eluát byl do hmotnostního spektrometru pouštěn mezi 2,5 až 4 minutou z důvodu co možná nejnižší kontaminace iontového zdroje ostatními látkami ze vzorku. Získaný chromatogram standardu nilotinibu je uveden v grafu 5. Můžeme vidět, že chromatografický pík nilotinibu nedosahuje uspokojivého tvaru a je rozmytý zepředu. Takto nesymetrický pík by mohl způsobovat problémy při integraci, a tedy ovlivnit

správnost stanovení nilotinibu. Z toho důvodu byla testována další chromatografická kolona.

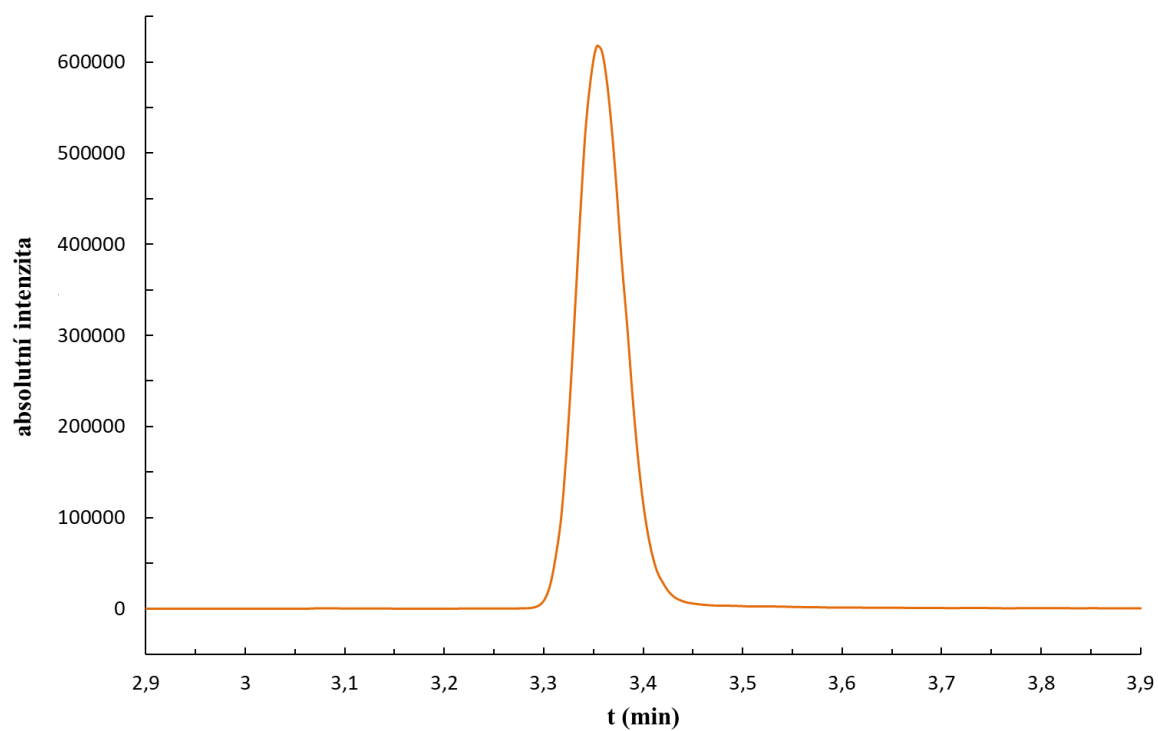
Dále byla používána kolona č. 3 Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2,1 mm, 1,7 μm od firmy Waters. Byly zachovány podmínky z předchozí kolony, pouze se změnou nástřiku (zde 2 μl). S použitím této kolony bylo dosaženo úzkého a symetrického tvaru píku (Graf 6). Za těchto optimálních podmínek byla měřena kalibrace bez použití séra (zkušební), kalibrace za použití séra (chromatogram kalibračního roztoku je na grafu 7), roztoky pro zjištění přesnosti a správnosti a reálné vzorky. Z grafu 7 (osa x odpovídá celé době analýzy) můžeme vidět, že matrice séra nijak neovlivnila retenční čas a tvar chromatografického píku nilotinibu.

Tabulka 4: Gradientová eluce.

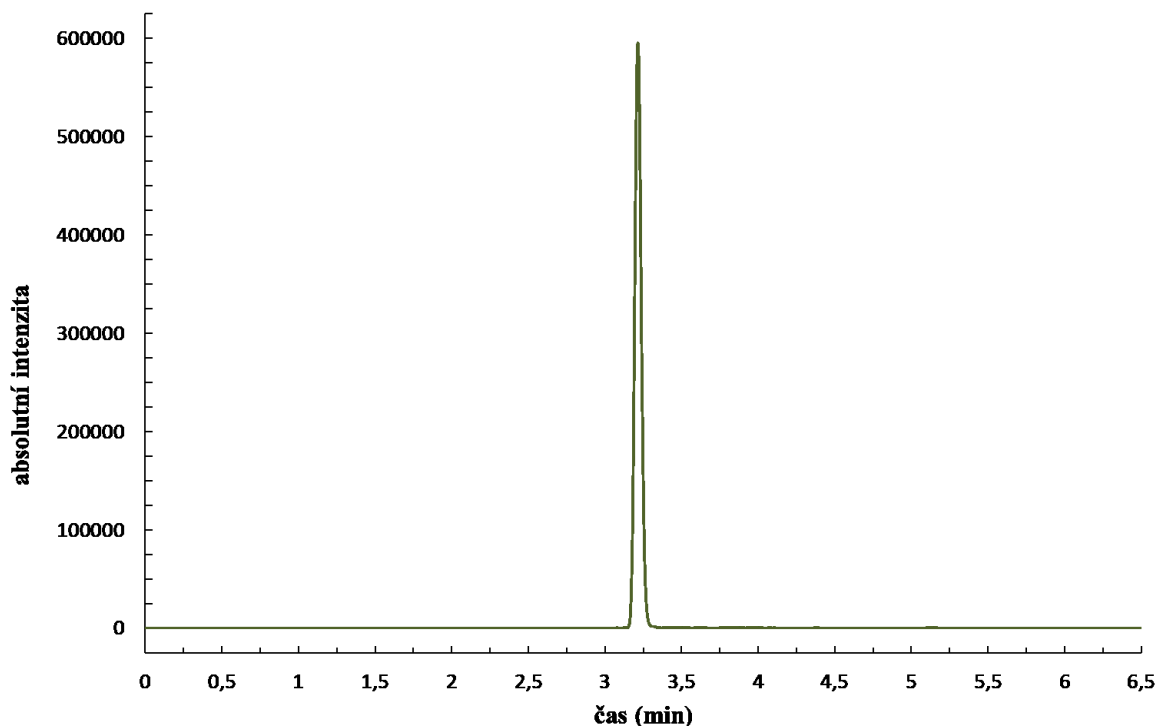
t (min)	H ₂ O (obj. %)	Methanol (obj. %)
0	60	40
0,5	60	40
1,5	10	90
3	10	90
3,5	60	40
6,5	60	40



Graf 5: Kolona Acquity UPLC HSS C18 SB 100x2,1 mm, 1,7 μm od firmy Waters, kalibrační roztok o koncentraci nilotinibu 12,5 ng/ml, bez séra.



Graf 6: Kolona Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2,1 mm, 1,7 μm od firmy Waters, kalibrační roztok o koncentraci nilotinibu 12,5 ng/ml, bez séra.

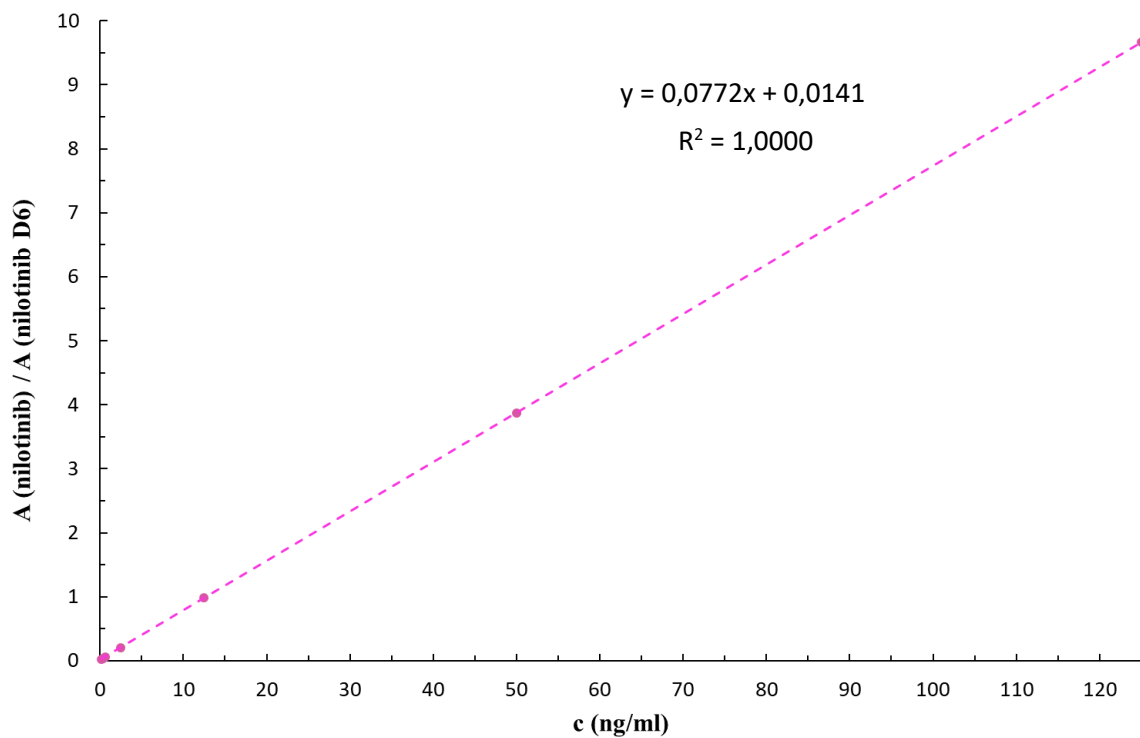


Graf 7: Kolona Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2,1 mm, 1,7 μm od firmy Waters, kalibrační roztok o koncentraci nilotinibu 12,5 ng/ml, se sérem.

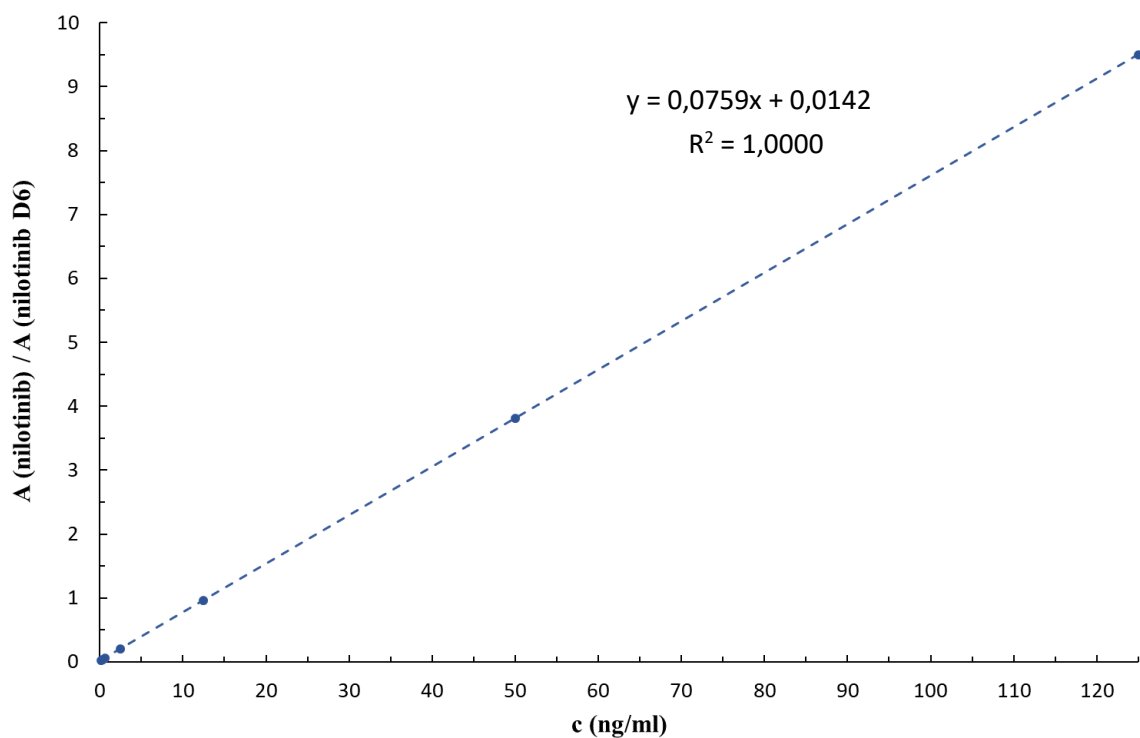
4.3 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí vážené lineární regrese dle váhového faktoru $1/x^3$ jako závislost poměru ploch píků nilotinibu (při přechodu 530,2 \rightarrow 289,10) a nilotinibu D6 (při přechodu 536,2 \rightarrow 295,15) na koncentraci nilotinibu v roztoku.

Nejdříve byla provedena kalibrace bez použití séra (Graf 8). Následně byla provedena kalibrace za použití séra (Graf 9), ze které vychází výpočty přesnosti a správnosti metody a výpočty koncentrace nilotinibu v reálných vzorcích. Porovnáním regresních rovnic obou kalibračních závislostí vidíme, že je dosaženo výborné linearitě s koeficientem determinace 1,0000. Dále můžeme vidět, že rozdíl směrnic je necelá 2 %. To znamená, že vliv matrice séra nijak neovlivňuje stanovení nilotinibu pomocí dané LC-MS/MS metody. Je to dáno použitím isotopicky značeného standardu, který eluuje ve stejném retenčním čase jako neznačený standard a jeho ionizace je tedy ovlivněna stejnými matričními efekty jako ionizace neznačeného standardu.



Graf 8: Kalibrační křivka s použitím vážené lineární regrese dle váhového faktoru $1/x^3$, bez séra.



Graf 9: Kalibrační křivka s použitím vážené lineární regrese dle váhového faktoru $1/x^3$, se sérem.

4.4 Správnost a přesnost metody

Správnost a přesnost metody byla hodnocena na třech koncentračních hladinách. Každá koncentrační hladina byla připravena třikrát. Výsledky přesnosti a správnosti jsou zaznamenány v tabulce 5.

Tabulka 5: Správnost a přesnost metody.

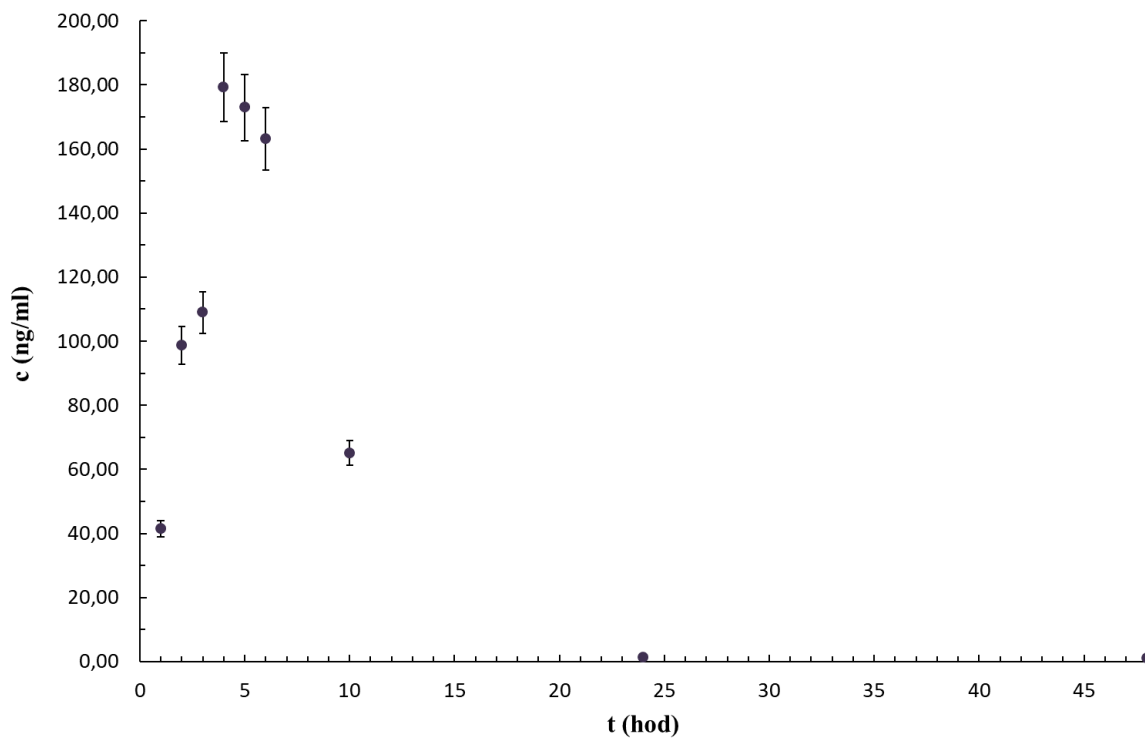
c (očekávaná) ng/ml	c (naměřená) ± SD ng/ml	RSD %	RE %
0,313	0,253 ± 0,023	8,6	-19,3
2,500	2,751 ± 0,149	5,4	10,1
50,000	55,442 ± 3,246	5,9	10,9

SD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka, RE – relativní chyba

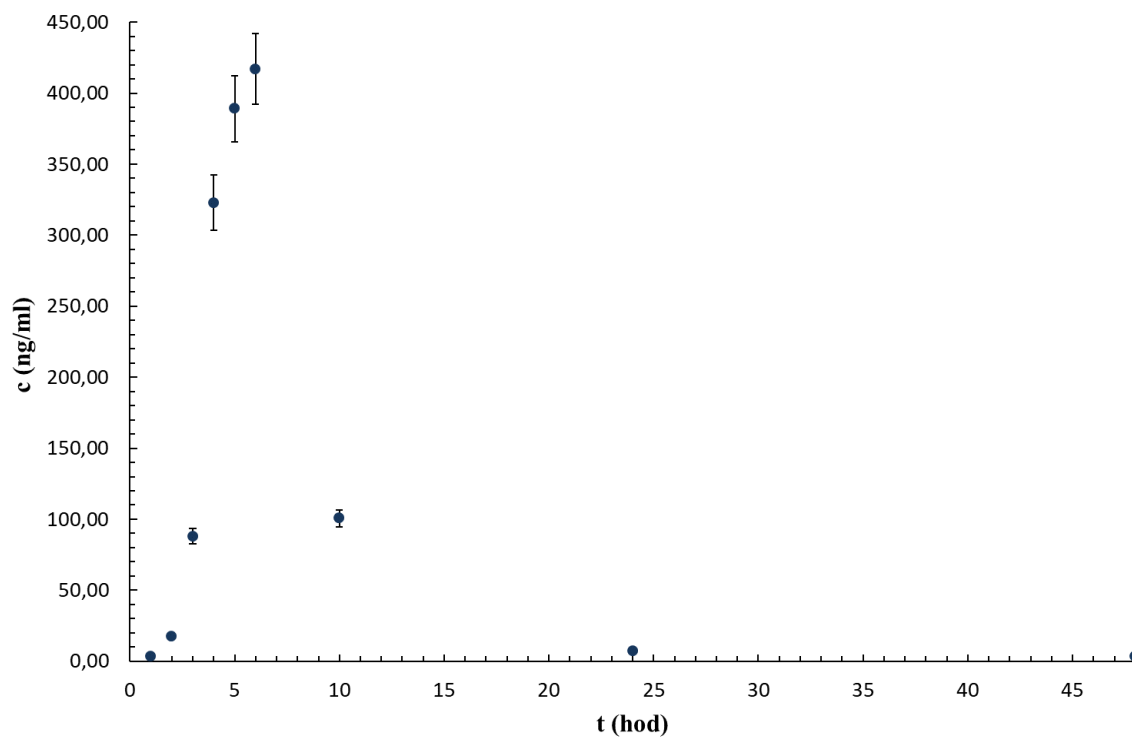
Přesnost dané metody se pohybovala od 5,4 do 8,9 %. Hodnoty správnosti, vyjádřené jako relativní chyba, byly na koncentračních hodnotách 2,5 a 50 ng/ml okolo 10, respektive 11 %. Vyšší relativní chyby bylo dosaženo pro nejnižší testovanou koncentrační hladinu a to 19,3 %. Dosažené správnosti a přesnosti splňují kritéria na bio-analytické aplikace.

4.5 Reálné vzorky

Měřeny byly 2 sady reálných vzorků, tedy vzorky odebírané v různých časových intervalech ze dvou krys. Byly vypočítány koncentrace nilotinibu v séru v těchto intervalech a sestaveny profily (Grafy 10, 11). Standardní nejistota měření byla vyjádřena jako směrodatná odchylka a byla vypočítána z průměrné hodnoty relativní směrodatné odchylky QC vzorků (RSD = 6 %). Získané profily budou z hlediska farmakologického hodnoceny skupinou prof. Ondřeje Slanaře z farmakologického ústavu, I.LF UK. Na základě hodnocení profilů budou upraveny inovativní formulace léčivého přípravku obsahující nilotinib ve farmaceutické firmě Zentiva.



Graf 10: Profil krysy (vzorky č. 311).



Graf 11: Profil krysy (vzorky č. 512).

5. Závěr

Tato práce vznikla ve spolupráci farmakologického ústavu, 1. LF UK, VŠCHT, farmaceutické firmy Zentiva a PřF UK. V rámci vývoje inovativní lékové formy nilotinibu bylo nutné sledovat farmakokinetický průběh uvolňování účinné látky v modelovém organismu – krysa. Cílem této bakalářské práce byl vývoj UHPLC-MS/MS metody ke stanovení nilotinibu v krysím séru.

V rámci této práce byl zoptimalizován separační krok pomocí UHPLC a nastavení MS/MS pro měření v MRM módu. Optimální nastavení UHPLC-MS/MS metody bylo následující. Chromatografická kolona Acquity UPLC BEH PHENYL 100x2,1 mm, 1,7 μ m od firmy Waters. Mobilní fáze se skládala z methanolu a destilované vody, obojí s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí při použití gradientové eluce (Tabulka 4). Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 40 °C, doba analýzy 6,5 minuty a objem nástřiku 2 μ l. Byl sledován MRM přechod pro nilotinib: 530,2 \rightarrow 289,10 (Q1 = -26 V; CE = -31 V; Q3 = -20 V) a pro nilotinib D6: 536,2 \rightarrow 295,15 (Q1 = -26 V; CE = -31 V; Q3 = -14 V). Nastavení iontového zdroje bylo následující: průtok nebulizačního plynu 3 l/min; průtok sušícího plynu 10 l/min; teplota zdroje 300 °C; teplota desolvatační kapiláry 250 °C.

Následně byla provedena kalibrace ve vodných vzorcích a spikovaném krysím séru a určena správnost a přesnost metody na třech koncentračních hladinách. Koeficient determinace byl 1,0000, což ukazuje výbornou linearitu. Správnost metody, vyjádřená v podobě relativní chyby, byla do 20 % a přesnost, vyjádřená v podobě RSD, byla do 9 %. Tyto hodnoty splňují validační kritéria na bio-analytické metody. Nově vyvinutá UHPLC-MS/MS metoda byla následně aplikována na stanovení koncentrace nilotinibu v krysím séru po podání nové lékové formulace.

6. Literatura

- (1) Friedecký, B.; Lemr, K. Úvod Do Hmotnostní Spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab. Časopis Čes. Spol. Klin. Biochem.* 2012, 20 (3), 152–157.
- (2) Schäfer, M. Mass Spectrometry: Fundamentals and Instrumentation. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2018.
- (3) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.
- (4) Harvey, D. J. Mass Spectrometry | Ionization Methods Overview. In *Encyclopedia of Analytical Science*; 2019; pp 398–410.
- (5) Tobolkina, E. New Analytical Tools Combining Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. PhD Thesis, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, 2014.
- (6) Glish, G. L.; Vachet, R. W. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2 (2), 140–150.
- (7) Lin, L.; Lin, H.; Zhang, M.; Dong, X.; Yin, X.; Qu, C.; Ni, J. Types, Principle, and Characteristics of Tandem High-Resolution Mass Spectrometry and Its Applications. *RSC Adv.* 2015, 5 (130), 107623–107636.
- (8) Wu, A. H.; Gerona, R.; Armenian, P.; French, D.; Petrie, M.; Lynch, K. L. Role of Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry (LC-HR/MS) in Clinical Toxicology. *Clin. Toxicol.* 2012, 50 (8), 733–742.
- (9) Roberto, R.-G.; Garrido Frenich, A. *Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis*; Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis; 2017.
- (10) Romero-González, R.; Aguilera-Luiz, M. M.; Plaza-Bolaños, P.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Food Contaminant Analysis at High Resolution Mass Spectrometry: Application for the Determination of Veterinary Drugs in Milk. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218 (52), 9353–9365.
- (11) Wright, L. G.; Schwartz, J. C.; Cooks, R. G. Hybrid Mass Spectrometers: Versatile Research Instruments. *TrAC Trends Anal. Chem.* 1986, 5 (9), 236–240.
- (12) Editors, S. Hybrid Mass Spectrometers <http://www.spectroscopyonline.com/hybrid-mass-spectrometers> (accessed Mar 20, 2020).
- (13) Kemper, P. R.; Dupuis, N. F.; Bowers, M. T. A New, Higher Resolution, Ion Mobility Mass Spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 287 (1–3), 46–57.

- (14) Laphorn, C.; Pullen, F.; Chowdhry, B. Z. Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry (IMS-MS) of Small Molecules: Separating and Assigning Structures to Ions. *Mass Spectrom. Rev.* 2013, 32 (1), 43–71.
- (15) Kanu, A. B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill, H. H. Ion Mobility-Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2008, 43 (1), 1–22.
- (16) El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2009, 44 (3), 210–230.
- (17) Rathore, A. S.; Joshi, S. Process Analysis: High Performance Liquid Chromatography. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2018.
- (18) Bélanger, J. M. R.; Jocelyn Paré, J. R.; Sigouin, M. Chapter 2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Elsevier, 1997; Vol. 18, pp 37–59.
- (19) Campíns-Falcó, P.; Herráez-Hernández, R.; Serra-Mora, P. Liquid Chromatography—Instrumentation. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2018.
- (20) Jandera, P. Programmed Elution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 2012, 1255, 112–129.
- (21) Jandera, P. Multidimensional Liquid Chromatography. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2018.
- (22) Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H. Core–Shell Particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 2014, 1357, 36–52.
- (23) Core shell particles
https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/GPC%20Event/2016/GPC_SEC/20160921%20-%20Waters%20GPC%20Event%2028-09-2016.pdf
- (24) Fekete, S.; Schappler, J.; Veuthey, J.-L.; Guillarme, D. Current and Future Trends in UHPLC. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014, 63, 2–13.
- (25) Plosker, G. L.; Robinson, D. M. Nilotinib: *Drugs* 2008, 68 (4), 449–459.
- (26) Druker, B. J. Translation of the Philadelphia Chromosome into Therapy for CML. *Blood* 2008, 112 (13), 4808–4817.

- (27) nilotinib (Tasigna, Novartis Europharm Ltd.), Státní ústav pro kontrolu léčiv <http://www.sukl.cz/leciva/em-nilotinib> (accessed Mar 21, 2020).
- (28) Nilotinib <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/nilotinib> (accessed Mar 21, 2020).
- (29) Fouad, M. A.; Elkady, E. F. Forced Degradation Study and Validated Stability-Indicating RP-LC Method for Determination of Nilotinib in Bulk and Capsules. *Acta Chromatogr.* 2014, 26 (4), 637–647.
- (30) Ivaturi, R.; Sastry, T. M.; Satyaveni, S. Development and Validation of a Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Nilotinib Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2016, 8 (9), 41–48.
- (31) Zeng, J.; Cai, H. L.; Jiang, Z. P.; Wang, Q.; Zhu, Y.; Xu, P.; Zhao, X. L. A Validated UPLC–MS/MS Method for Simultaneous Determination of Imatinib, Dasatinib and Nilotinib in Human Plasma. *J. Pharm. Anal.* 2017, 7 (6), 374–380.
- (32) Veeraraghavan, S.; Thappali, S.; Viswanadha, S.; Chennupati, S.; Nalla, S.; Golla, M.; Vakkalanka, S.; Rangasamy, M. Simultaneous Quantification of Ruxolitinib and Nilotinib in Rat Plasma by LC-MS/MS: Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 94, 125–131.
- (33) Hsieh, Y.; Galviz, G.; Zhou, Q.; Duncan, C. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Dasatinib, Imatinib and Nilotinib in Mouse Plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 2009, 23 (9), 1364–1370.
- (34) D’Avolio, A.; Simiele, M.; De Francia, S.; Ariaudo, A.; Baietto, L.; Cusato, J.; Fava, C.; Saglio, G.; Di Carlo, F.; Di Perri, G. HPLC-MS Method for the Simultaneous Quantification of the Antileukemia Drugs Imatinib, Dasatinib and Nilotinib in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 59 (1), 109–116.
- (35) Yilmaz, E. M.; Aydoğmuş, Z.; Aboul-Enein, H. Y. Determination of Nilotinib in Spiked Plasma, Urine, and Capsules by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection. *Acta Chromatogr.* 2016, 28 (3), 313–331.
- (36) Pirro, E.; De Francia, S.; De Martino, F.; Racca, S.; Di Carlo, F.; Fava, C.; Ulisciani, S.; Rege Cambrin, G.; Saglio, G. A New HPLC-UV Validated Method for Therapeutic Drug Monitoring of Tyrosine Kinase Inhibitors in Leukemic Patients. *J. Chromatogr. Sci.* 2011, 49 (10), 753–757.

- (37) Wojnicz, A.; Colom-Fernández, B.; Steegmann, J. L.; Muñoz-Calleja, C.; Abad-Santos, F.; Ruiz-Nuño, A. Simultaneous Determination of Imatinib, Dasatinib, and Nilotinib by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Application to Therapeutic Drug Monitoring: *Ther. Drug Monit.* 2017, 39 (3), 252–262.