

*На правах рукописи*



**АРЧАКОВА**

**Ольга Александровна**

**РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТОВ ЛАПШАКОНИТИНА**

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва

2024

Работа выполнена в исследовательском центре общества с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики»

Научный руководитель:

**Шохин Игорь Евгеньевич**

доктор фармацевтических наук

Официальные оппоненты:

**Селиванова Ирина Анатольевна**

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры химии

**Каленикова Елена Игоревна**

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», заведующая кафедрой фармацевтической химии и организации фармацевтического дела

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «27» июня 2024 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте диссертационного совета (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 21.2.063.01,  
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных причин смертности во всем мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний умирает более 17 миллионов человек, что составляет 32 % от общего количества смертей. С 2000 года число случаев смерти от сердечно-сосудистых заболеваний возросло более чем на 2 миллиона и в 2019 году достигло почти 9 миллионов. Одно из ведущих мест среди патологий сердечно-сосудистой системы и их последствий занимают нарушения сердечного ритма.

Такие виды аритмий как желудочковые тахикардии, трепетание и фибрилляция желудочков являются наиболее важными факторами риска развития внезапной сердечной смерти. Тяжелая желудочковая тахикардия или фибрилляция могут быть фатальными, и это происходит, когда сердце не может перекачивать кровь в нормальном темпе для обеспечения эффективного сердечного выброса. Ежегодная частота возникновения внезапной сердечной смерти варьирует от 0,36 до 1,28 случая на 1 тысячу населения. Сердечная аритмия, характеризующаяся нерегулярными циклами сердцебиения, затрагивает более 33 миллионов человек, а также ложится тяжелым бременем на системы здравоохранения многих стран. Желудочковая аритмия является причиной около 80 % внезапных сердечных приступов. Также возникновение аритмий является одним из самых частых осложнений новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной штаммом коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2).

Фармакотерапия аритмий в настоящее время является одной из важных проблем кардиологии в связи с недостаточной изученностью антиаритмических препаратов. Высокая вероятность развития нежелательных явлений, сложность выбора определенного лекарственного препарата или комбинации лекарственных препаратов в конкретном клиническом случае – все это не позволяет в полной мере обеспечить достижение эффективной и безопасной терапии аритмий. В связи с этим является актуальным не только разработка новых антиаритмических лекарственных препаратов, но также и детальное изучение лекарственных средств, которые давно существуют на отечественном фармацевтическом рынке.

На территории Российской Федерации в клинической практике активно применяют лаптаконитина гидробромид для лечения желудочковой и наджелудочковой экстрасистолии, пароксизмальной наджелудочковой тахикардии, в том числе и при синдроме Вольфа-Паркинсона-Уайта, пароксизмах трепетания и мерцания предсердий, пароксизмальной желудочковой тахикардии в случае отсутствия органических изменений миокарда. Терапия нарушений ритма сердца с помощью антиаритмических препаратов, в частности препаратов лаптаконитина гидробромида, нередко сопровождается нежелательными явлениями, преимущественно связанными с аритмогенным действием. Причиной могут быть большие дозы

препарата, оказывающие токсическое действие на организм человека, увеличение скорости его введения, взаимодействие с другими лекарственными средствами, заболевания печени и почек, нарушения электролитного баланса. И поскольку фармакокинетика препаратов лапаконитина изучена не в полной мере, то для обеспечения безопасности использования данных лекарственных средств возникает необходимость ее полноценного изучения.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время в научной литературе представлены опубликованные данные по метаболизму лапаконитина в микросомах печени крыс и человека. Особое внимание при этом уделяется N-дезацетиллапаконитину, который также обладает высокой антиаритмической активностью.

В рецензируемых научных изданиях представлены немногочисленные методики определения лапаконитина в биологических матрицах животных, аналитические диапазоны которых адаптированы для проведения доклинических исследований. При этом отсутствуют данные о совместном определении лапаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллапаконитина в биологических матрицах человека в рамках аналитических диапазонов, которые позволили бы надлежащим образом описать фармакокинетические параметры каждого из анализируемых веществ в рамках проведения клинических исследований препаратов лапаконитина.

**Цель диссертационной работы.** Разработка и валидация методики количественного определения лапаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллапаконитина в биологической матрице методом ВЭЖХ-МС/МС для последующего изучения фармакокинетики лекарственных препаратов на основе лапаконитина гидробромида в рамках клинических испытаний.

**Задачи диссертационного исследования.**

1. Разработать методику совместного определения лапаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллапаконитина в плазме крови человека и в цельной крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

2. Провести выбор биологической матрицы для оценки полной валидации биоаналитической методики совместного определения лапаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллапаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС и анализа образцов от добровольцев в рамках клинического этапа исследования лекарственных препаратов на основе лапаконитина гидробромида.

3. Провести полную валидацию методики определения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина в выбранной биологической матрице методом ВЭЖХ-МС/МС.

4. Провести анализ образцов биологической матрицы здоровых добровольцев, принимавших участие в клиническом исследовании лекарственных препаратов на основе

лаппаконитина гидробромида на основании протокола клинического исследования, утвержденного Минздравом России.

5. Рассчитать фармакокинетические параметры на основании полученных концентраций лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в образцах биологической матрицы здоровых добровольцев в рамках проведения клинического исследования лекарственного препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия).

**Научная новизна исследования.** В работе впервые изучены биоаналитические аспекты исследования фармакокинетики антиаритмических лекарственных препаратов на основе лаппаконитина гидробромида, в том числе представлен поход к выбору биологической матрицы и аналитического диапазона для проведения данного исследования. Впервые произведен расчет основных фармакокинетических параметров лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в рамках клинических испытаний лекарственных препаратов на основе лаппаконитина гидробромида. Разработанная методика может быть впоследствии применена для исследований фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов лаппаконитина в различных дозировках.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В данной работе представлены подходы к разработке и валидации методики совместного определения лаппаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в биологических матрицах человека с использованием современных физико-химических методов анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-селективным детектированием), приведено обоснование выбора биологической матрицы и аналитических диапазонов для анализа веществ с ранее неизученной фармакокинетикой.

Предложенные методологические основы и подходы к разработке, описанные в настоящей работе, внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «ЦФА» (акт внедрения от 28.11.2023 г.).

Результаты изучения фармакокинетики лекарственного препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) внесены в регистрационное досье фармацевтической компанией АО «Фармцентр ВИЛАР» (акт внедрения от 01.09.2023 г.).

Методика определения лаппаконитина и его активного метаболита в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС внедрена в образовательный процесс по токсикологической химии по разделу «Группа веществ, изолируемых из биоматериалов методом экстракции» и в научно-исследовательскую деятельность кафедры фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии (акт внедрения от 22.12.2023 г.).

Аналитические подходы к проведению исследований фармакокинетики препаратов лаптаконитина внедрены в научно-исследовательскую деятельность ИЛ ЦККЛС ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт внедрения от 15.03.2024 г.).

**Методология и методы исследования.** Исследование было выполнено с использованием современного физико-химического метода анализа – высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием, который является методом выбора при проведении биоаналитических исследований, согласно опубликованным научным данным.

Валидационный, аналитический и фармакокинетический этапы исследования проводились в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Данный нормативный документ является регламентирующим при проведении биоаналитических исследований на территории Российской Федерации.

Обработка результатов, полученных в ходе проведения валидационного и аналитического этапов исследования, проводилась с использованием метода наименьших квадратов, а также расчетов относительного стандартного отклонения и относительной погрешности. Для расчета фармакокинетических параметров использовались методы описательной статистики.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Результаты разработки и валидации методики совместного определения лаптаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

2. Алгоритм выбора биологической матрицы для оценки полной валидации биоаналитической методики совместного определения лаптаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС и анализа образцов от добровольцев в рамках клинического этапа исследования лекарственных препаратов на основе лаптаконитина гидробромида.

3. Подход к выбору аналитического диапазона для проведения биоаналитического этапа исследования лекарственных препаратов с неустановленной фармакокинетикой на примере лаптаконитина гидробромида и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина.

4. Результаты проведения фармакокинетического исследования в виде фармакокинетических профилей и фармакокинетических параметров для лекарственного препарата Аллафортэ<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), полученные в рамках проведения аналитического этапа исследования сравнительной фармакокинетики препарата Аллафортэ<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО

«Фармцентр ВИЛАР», Россия) и аналогичного препарата отечественного производителя в рамках апробации разработанной и валидированной методики совместного определения лаппаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина.

**Степень достоверности и апробация работы.** Основные результаты работы доложены на научно-практической конференции «Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследование препаратов в условиях пандемии COVID-19» в секции «ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС в исследованиях лекарственных средств» (Москва, 2020), на бизнес-форуме в сфере фармацевтики и биотехнологий IPhEB Russia 2023 в секции «Линия тренда аналитических исследований в фармации, фудтехе и агробиоразработках» (Санкт-Петербург, 2023), на конференции GLP-PLANET IV в сессии «Применение современных аналитических методов для изучения фармакокинетики и контроля качества лекарственных средств» (Санкт-Петербург, 2023), на IX Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» в секции «Фармакология, клиническая фармакология» (Воронеж, 2023), на конгрессе «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» в секции «Вопросы химико-аналитических исследований» (Москва, 2023), на II Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» в секции «Контроль качества лекарственных средств и специализированных продуктов питания» (Томск, 2023), на международном конгрессе «Разработка и регистрация лекарственных средств» в секции «Валидация аналитических методик: биоаналитика VS стандартизация» (Москва, 2024).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, рекомендованные ВАК Минобрнауки России, которые включены в наукометрическую базу данных Scopus.

**Связь задач исследования с планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ООО «ЦФА».

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пункту 4: Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведена разработка, валидация методики

определения лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, проведение анализа испытуемых образцов от добровольцев в рамках разработанной и валидированной методики, а также обработка полученных результатов. Личный вклад автора составил не менее 90 %.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 145 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 21 рисунком и 69 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (2 главы) и заключения, списка литературы, включающего 126 источников, из них 48 источников – на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

Лаптаконитин – С18-дитерпеновый алкалоид, получаемый из растений, принадлежащих к роду Аконит (*Aconitum*) семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*). Лекарственные препараты на основе лаптаконитина гидробромида в течение длительного времени используются для терапии наджелудочковых и желудочковых аритмий на территории Российской Федерации. В процессе метаболизма данного лекарственного средства в организме человека образуется ряд соединений, однако выраженную фармакологическую активность среди них проявляет N-дезацетиллаптаконитин. Структурные формулы лаптаконитина (ЛАП) и N-дезацетиллаптаконитина (ДЕЗ) представлены на рисунках 1 и 2, соответственно.

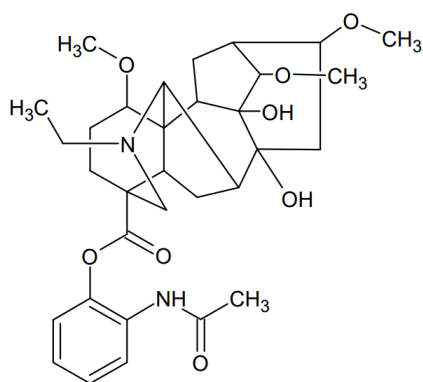


Рисунок 1 – Структурная формула лаптаконитина

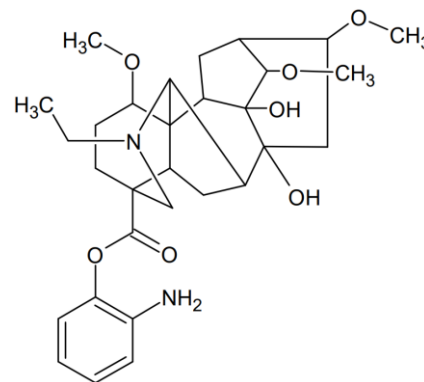


Рисунок 2 – Структурная формула N-дезацетиллаптаконитина

### Глава 2. Материалы и методы

#### Объекты исследования:

- субстанция лаптаконитина гидробромида (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), количественное содержание 100,07 %; субстанция N-дезацетиллаптаконитина (АО «Фармцентр ВИЛАР»,



Россия), количественное содержание 99,37 %; стандартный образец тримебутина (LGC, Великобритания), количественное содержание 99,37 %;

- интактная плазма крови (интактная гемолизная плазма крови, интактная хилезная плазма крови), интактная цельная кровь здоровых добровольцев с добавлением  $K_2EDTA$  в качестве антикоагулянта.

#### Реактивы:

- метанол, класс «UHPLC-grade»; ацетонитрил, класс «LC-MS grade»; вода Milli-Q; муравьиная кислота, класс «98 % pure»; аммиак водный, класс «for analysis».

#### Оборудование и мерная посуда:

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera XR с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь) (Shimadzu Corporation, Япония);
- весы аналитические, класс точности Специальный – I (ГОСТ 24104-01), (A&D Company Ltd., Япония); дозаторы одноканальные различного объема (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия); вортекс-шейкер (Heidolph ReaxTop, Германия); центрифуги медицинские CM-50M (СИА «ЭЛМИ», Латвия); холодильник фармацевтический (LIEBHERR, Германия); морозильник микропроцессорный MM-180/20/35 (АО «ПОЗИС», Россия);
- колбы мерные класса А различного объема.

#### Программное обеспечение:

- LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония); Microsoft Excel (США); R Project 3.5.1 (расширение «beag», версия 2.8.3-2) (разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань).

## Глава 3. Результаты и обсуждения

### Разработка методики совместного определения лаптаконитина и

### N-дезацетиллаптаконитина в биологических матрицах методом ВЭЖХ-МС/МС

1. Выбор внутреннего стандарта. На основании физико-химических свойств лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в качестве внутреннего стандарта был выбран тримебутин (рисунок 3).

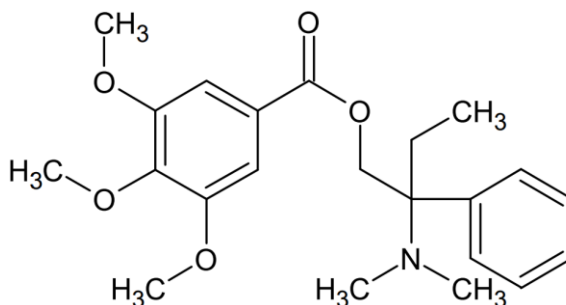


Рисунок 3 – Структурная формула тримебутина

2. Разработка условий масс-спектрометрического детектирования. Разработку условий масс-спектрометрического детектирования проводили с использованием электроспрея в положительном режиме ионизации с помощью инъекций метанольных растворов исследуемых веществ. В рамках первого этапа проводили сканирование прекурсор-ионов на первом квадруполе (рисунки 4–6).

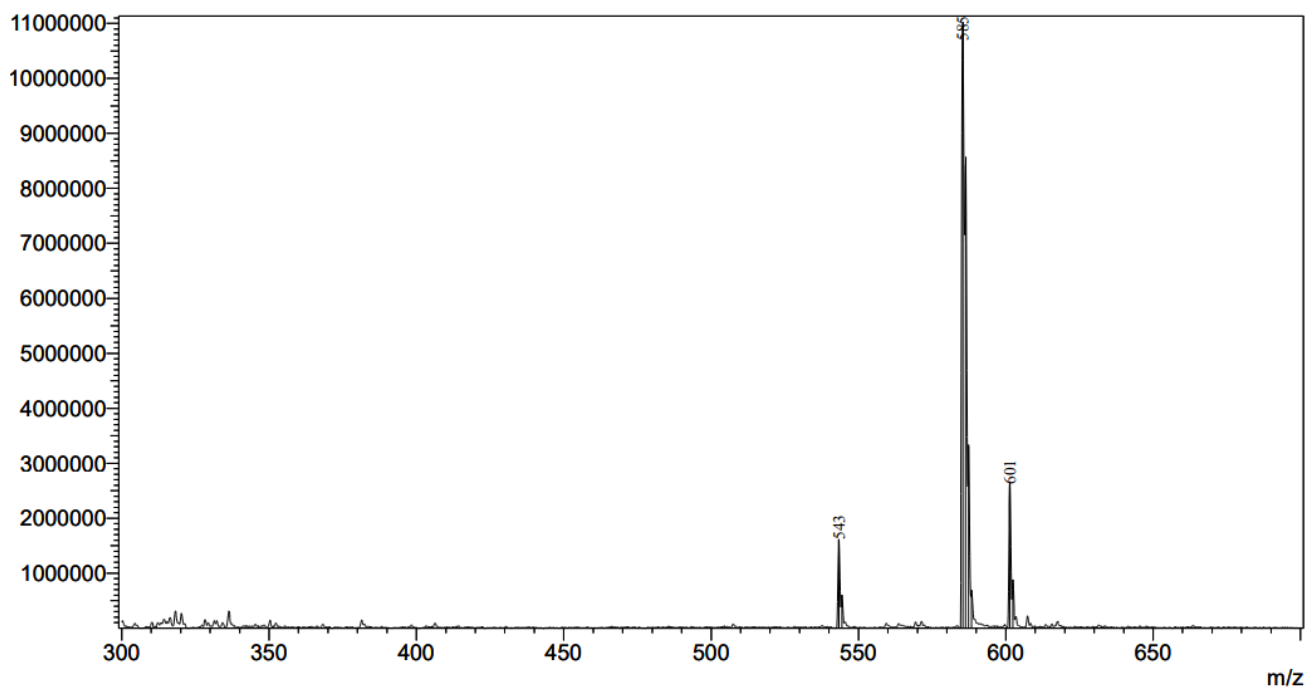


Рисунок 4 – Масс-спектр метанольного раствора лапаконитина (первый квадруполь)

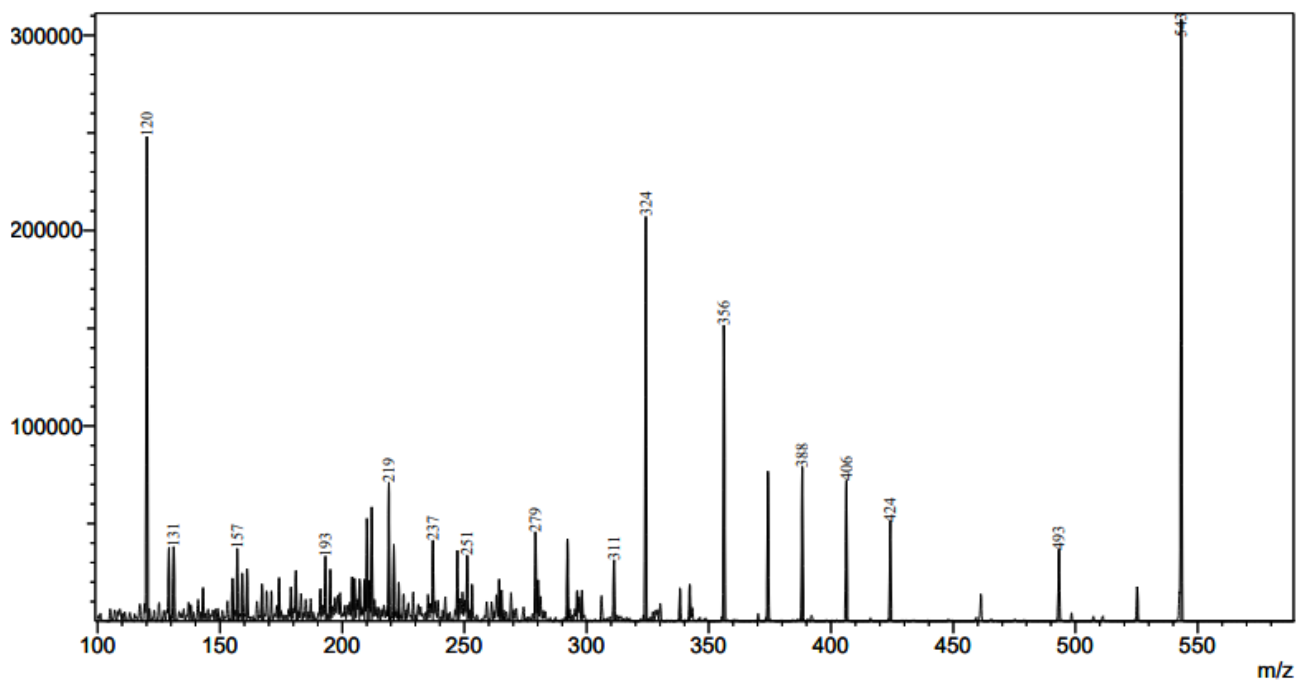


Рисунок 5 – Масс-спектр метанольного раствора N-дезацетиллапаконитина (первый квадруполь)

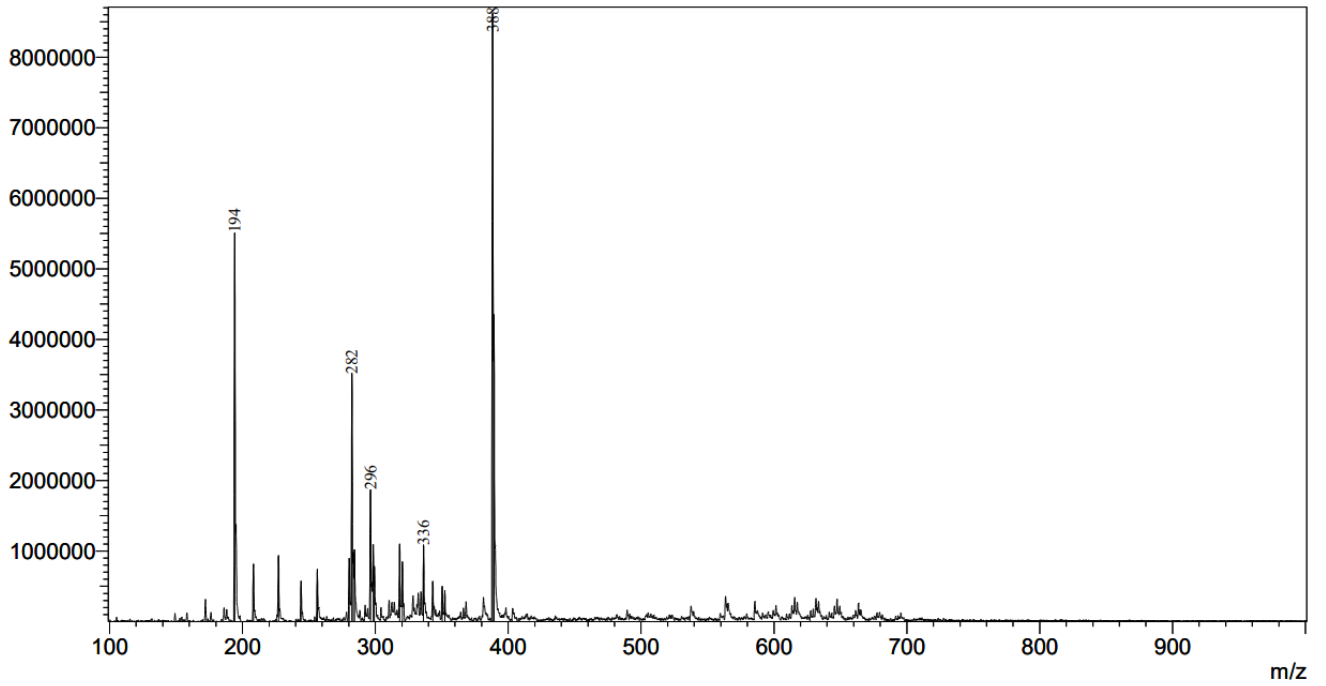


Рисунок 6 – Масс-спектр метанольного раствора тримебутина (первый квадруполь)

Определение дочерних ионов проводили в режиме сканирования поступающих ионов на третий квадруполь масс-спектрометрического детектора. В результате были получены масс-спектры, представленные на рисунках 7–9.

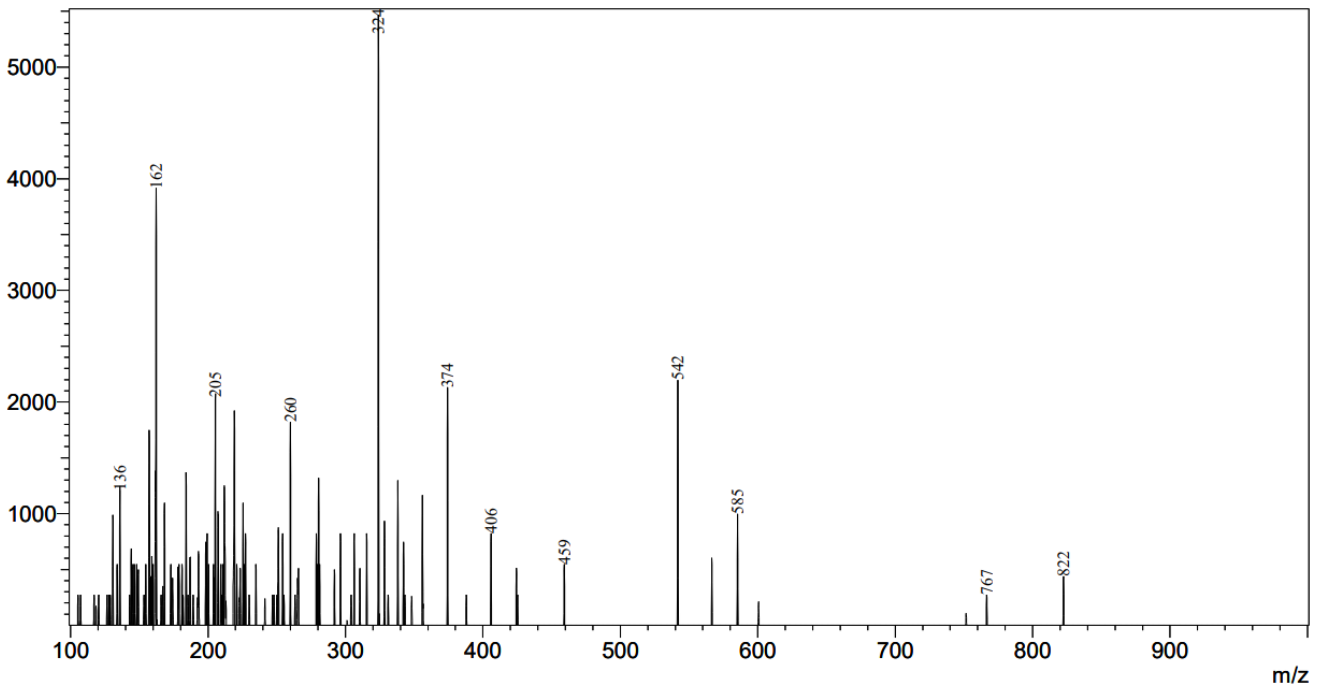


Рисунок 1 – Масс-спектр метанольного раствора лапаконитина (третий квадруполь)

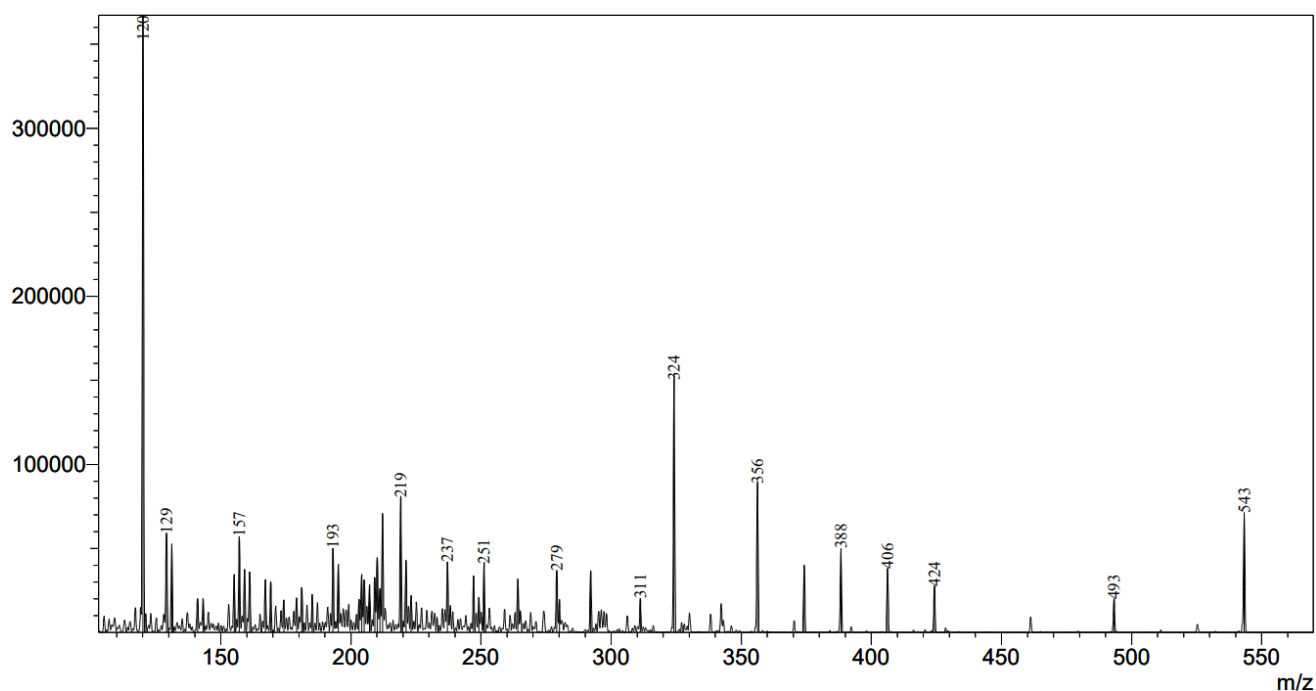


Рисунок 2 – Масс-спектр метанольного раствора N-дезацетиллапаконитина (третий квадруполь)

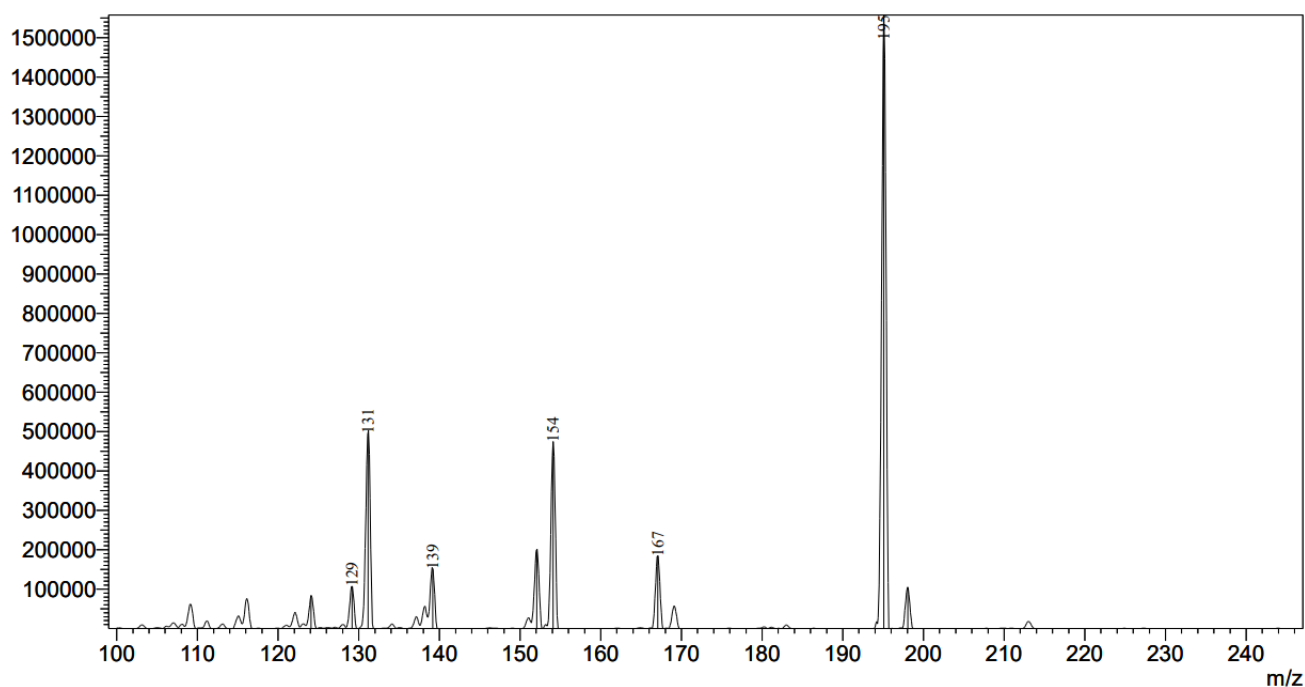


Рисунок 3 – Масс-спектр метанольного раствора тримебутина (третий квадруполь)

Далее проводили подбор напряжения на капилляре электроспрея для увеличения интенсивности сигналов в диапазоне от +0,1 кВ до 5,0 кВ. Максимальная интенсивность сигналов наблюдалась при значении напряжения +4,25 кВ.

Исходя из полученных значений прекурсор-ионов и дочерних ионов была произведена автооптимизация методики, в рамках которой масс-спектрометрическая система автоматически подбирает оптимальное напряжение в различных частях оптической системы масс-

спектрометрического детектора, а также энергию соударения в ячейке соударения для достижения максимально интенсивных сигналов.

Программа оптимизировала полученные значения дочерних ионов и прекурсор-ионов на основании подобранных условий в масс-спектрометрическом детекторе. Были получены следующие MRM-переходы:

585,30 → 324,15 m/z, 585,30 → 162,15 m/z для лаппаконитина;

543,25 → 324,10 m/z; 543,25 → 120,10 m/z для N-дезацетиллаппаконитина;

388,20 → 195,10 m/z, 388,20 → 131,05 m/z для тримебутина.

Дополнительно системой были обнаружены интенсивный прекурсор-ион N-дезацетиллаппаконитина (544,25 m/z) и его дочерние ионы (120,00 m/z и 325,25 m/z), а также интенсивный дочерний ион тримебутина (195,10 m/z) при подобранных значениях напряжений в различных частях оптической системы масс-спектрометрического детектора, а также значений энергии соударения. В результате были получены дополнительные MRM-переходы:

544,25 → 120,00 m/z, 544,25 → 325,25 m/z для N-дезацетиллаппаконитина;

388,20 → 198,05 m/z для тримебутина.

3. Разработка условий хроматографического разделения. Выбрана хроматографическая колонка YMC-Pack Pro C18 (100×2,0 мм, 3 мкм), которая обеспечивала хорошее удерживание анализируемых веществ. В качестве подвижной фазы были выбраны 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему) в качестве элюента А и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему) в качестве элюента В. Поскольку анализируемые вещества являются слабыми основаниями, то добавление муравьиной кислоты в качестве модификатора подвижной фазы обеспечило более симметричную форму хроматографических пиков, а также увеличение ионизации анализируемых молекул в источнике ионизации за счет диссоциации муравьиной кислоты в водной среде с образованием протонов водорода. Элюирование анализируемых веществ проводилось при скорости потока 0,7 мл/мин в градиентном режиме.

В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения, поскольку является наиболее быстрым, простым и экономичным в сравнении с жидкость-жидкостной и твердофазной экстракцией. В качестве осадителя был выбран ацетонитрил, поскольку его использование при пробоподготовке биологических образцов обеспечивало более симметричную форму и высокую интенсивность хроматографических пиков в сравнении с другими органическими растворителями.

Примеры полученных хроматограмм образцов плазмы крови и цельной крови человека, содержащих лаппаконитин, N-дезацетиллаппаконитин и тримебутин, приведены на рисунках 10–11.

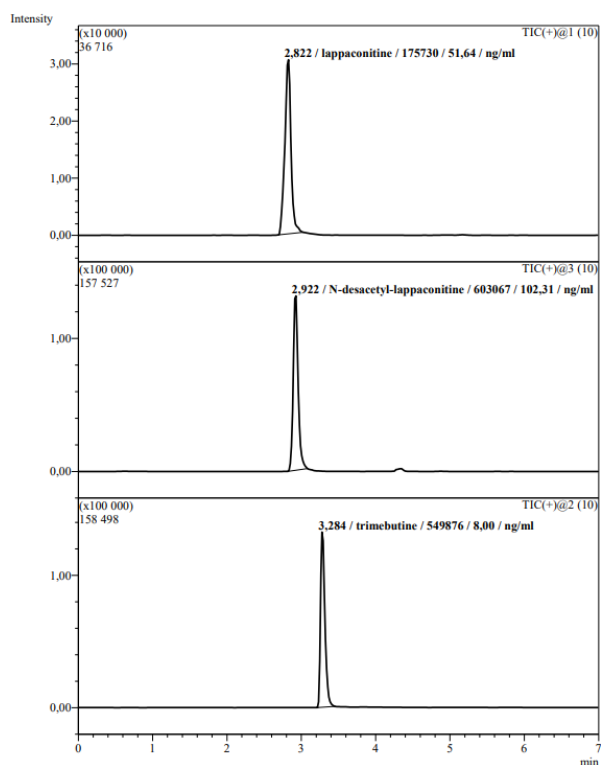
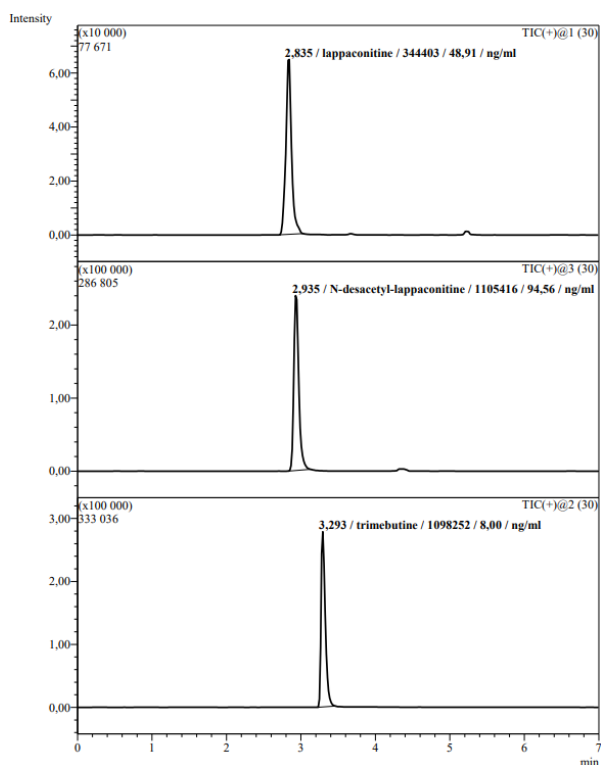


Рисунок 10 – Хроматограмма образца плазмы крови человека, содержащего лаппаконитин, N-дезацетиллаппаконитин и тримебутин (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

Рисунок 11 – Хроматограмма образца цельной крови человека, содержащего лаппаконитин, N-дезацетиллаппаконитин и тримебутин (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

4. Выбор аналитических диапазонов методики. Поскольку в литературных источниках отсутствуют данные об оценке фармакокинетических параметров лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина, то было принято решение использовать «оценочный» подход для выбора аналитических диапазонов анализируемых веществ. Данный подход включал в себя следующую последовательность действий:

- ✓ анализ калибровочных образцов в аналитическом диапазоне 1,00–1000,00 нг/мл для лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина и последующее построение калибровочного графика;
- ✓ анализ образцов биологической матрицы от здоровых добровольцев, принимавших участие в клиническом исследовании препаратов лаптаконитина гидробромида;
- ✓ расчёт концентраций образцов биологической матрицы добровольцев по построенному калибровочному графику;
- ✓ корректировка аналитических диапазонов для лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина на основании полученных результатов: для лаптаконитина аналитический диапазон методики составил 0,5–50,00 нг/мл, для N-дезацетиллаптаконитина – 0,50–100,00 нг/мл.

### **Валидационный этап исследования и выбор биологической матрицы**

Валидация методики определения лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в биологической матрице проводилась согласно следующей актуальной отечественной и зарубежной нормативной документации:

- 1) Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.;
- 2) Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018;
- 3) Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2012;
- 4) Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под. ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.

Была произведена оценка следующих валидационных параметров: селективность, калибровочная кривая, точность (внутри валидационного цикла и между валидационными циклами), прецизионность (внутри валидационного цикла и между валидационными циклами), эффект матрицы, степень извлечения, стабильность, перенос пробы, отсутствие влияния степени разбавления образцов.

Селективность (плазма крови и цельная кровь человека). На хроматограммах образцов интактной плазмы крови человека, а также образцов интактной цельной крови человека отсутствовали сигналы, соответствующие временам удерживания лаптаконитина, N-дезацетиллаптаконитина и тримебутина.

Эффект матрицы (плазма крови и цельная кровь человека). Среднее значение CV фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, составило 6,80 % (плазма крови) и 7,68 % (цельная кровь) для лапаконитина, а также 6,47 % (плазма крови) и 7,11 % (цельная кровь) для N-дезацетиллапаконитина (*критерий приемлемости – не более 15,00 %*).

Степень извлечения (плазма крови и цельная кровь человека). Среднее значение RSD степени извлечения составило 13,31 % (плазма крови) и 6,99 % (цельная кровь) для лапаконитина, а также 10,21 % (плазма крови) и 8,56 % (цельная кровь) для N-дезацетиллапаконитина (*критерий приемлемости – не более 15,00 %*).

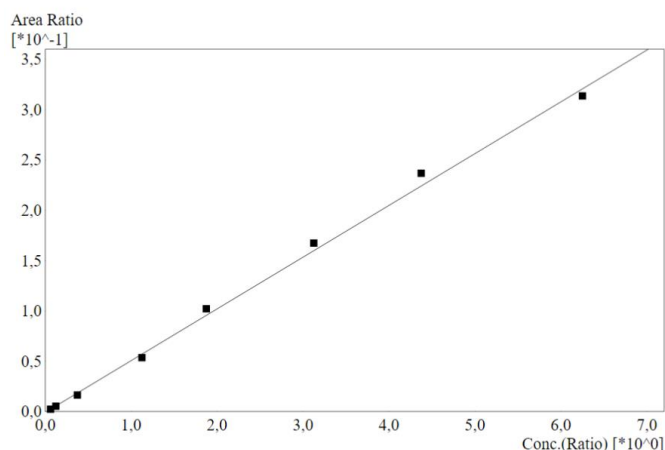
**Выбор биологической матрицы.** Выбор биологической матрицы в качестве объекта исследования проводили на основании оценки селективности, эффекта матрицы, степени извлечения методики. Были получены надлежащие результаты как для плазмы крови человека, так и для цельной крови человека, в связи с чем было принято решение также оценить удобство работы с каждой из биологических матриц.

Поскольку за счет форменных элементов цельной крови данная биологическая матрица является более вязкой в сравнении с плазмой крови, то дозирование большого количества образцов цельной крови в процессе проведения аналитического этапа исследования является более затруднительным и может привести к удлинению процесса пробоподготовки биологических образцов, а также к увеличению риска контаминации при использовании одного дозатора. Также стоит отметить, что при использовании осаждения в качестве способа пробоподготовки цельной крови в образующемся супернатанте остается некоторое количество гемоглобина, образовавшегося в процессе гемолиза эритроцитов при заморозке биологических образцов, которое в последствии может подвергаться денатурации в источнике ионизации и в камере ионизации под воздействием высоких температур, что приведет к быстрому загрязнению масс-спектрометрического детектора и снижению интенсивности сигналов анализируемых веществ. В связи с этим было принято решение использовать плазму крови человека в качестве биологической матрицы для проведения оценки остальных валидационных параметров, а также аналитического этапа исследования.

Градуировочная кривая (плазма крови человека). В результате анализа калибровочных образцов были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика лапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации лапаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика N-дезацетиллапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации N-дезацетиллапаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови. Примеры калибровочных графиков приведены на рисунках 12–13.



Batch : C:\LabSolutions\Data\lappaaconitine\val\val1.lcb  
 Name : lappaconitine  
 Quantitative Method : Internal Standard  
 Function :  $f(x)=0,0514467*x-0,000909847$   
 Rr1=0.9977667 Rr2=0.9955383  
 FitType : Linear



Batch : C:\LabSolutions\Data\lappaaconitine\val\val1.lcb  
 Name : N-desacetyl-lappaconitine  
 Quantitative Method : Internal Standard  
 Function :  $f(x)=0,0853660*x-0,00245705$   
 Rr1=0.9966994 Rr2=0.9934097  
 FitType : Linear

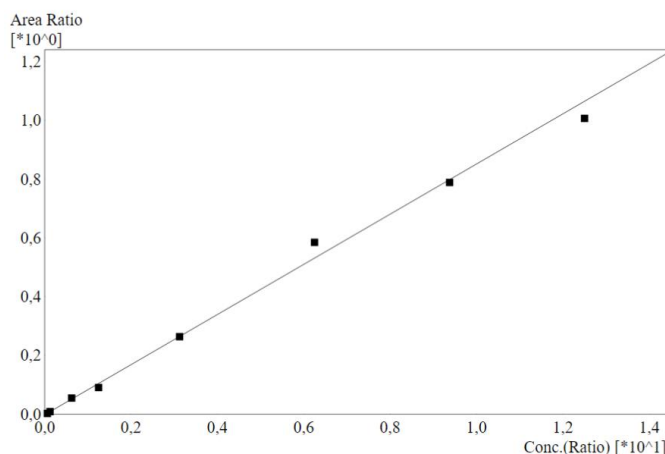


Рисунок 12 – Калибровочный график в координатах отношение площади пика лаппаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации лаппаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови

Рисунок 13 – Калибровочный график в координатах отношение площади пика N-дезацетиллаппаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации N-дезацетиллаппаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений соответствовали критериям приемлемости (значения относительной погрешности полученных результатов должны находиться в диапазоне от -20,00 % до 20,00 % для калибровочного образца с концентрацией на уровне НПКО, в диапазоне от -15,00 % до 15,00 % – для остальных калибровочных образцов).

Точность и прецизионность (плазма крови человека). Рассчитанные величины относительного стандартного отклонения для оценки прецизионности (не более 20,00 % на уровне НПКО, не более 15,00 % – для остальных точек) и относительной погрешности для оценки точности (в диапазоне от -20,00 % до 20,00 % на уровне НПКО, от -15,00 % до 15,00% – для остальных точек) соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки точности и прецизионности между циклами 1–3 приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Расчет точности и прецизионности методики между валидационными циклами 1–3

Уровень	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, среднее значение (n=5), нг/мл		RSD (n=15), %		E, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
LLOQ	0,50	0,50	0,52	0,49	7,53	6,21	3,73	-1,47
L	1,50	1,50	1,38	1,38	4,79	5,37	-8,09	-7,87
M	15,00	30,00	13,65	27,05	3,62	2,54	-9,02	-9,82
H	40,00	80,00	37,90	72,68	2,10	3,52	-5,25	-9,15

Стабильность (плазма крови человека). Были подтверждены следующие виды стабильностей:

- ✓ краткосрочная – «настолярная» стабильность при комнатной температуре в течение 6 часов;
- ✓ краткосрочная – «постпрепаративная» стабильность при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 24 часов;
- ✓ стабильность анализируемых веществ при трехкратной заморозке-разморозке биологических образцов при температуре от -40 °С до -35 °С в течение 36 часов в условиях заморозки и при комнатной температуре в течение 6 часов в условиях разморозки;
- ✓ стабильность стандартных растворов анализируемых веществ при температуре от -40 °С до -35 °С в течение 20 дней;
- ✓ долгосрочная стабильность при температуре от -40 °С до -35 °С в течение 50 дней.

Отсутствие влияния разбавления образцов – плазма крови человека. Показана возможность разбавления образцов в 2 раза при необходимости (если значения концентраций лаптаконитина и/ или N-дезацетиллаптаконитина превышают ВПКО методики).

#### **Аналитический и фармакокинетический этапы исследования**

Разработанная и валидированная методика была апробирована в рамках клинического исследования фармакокинетики препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия).

В рамках аналитического этапа исследования был произведен анализ образцов от здоровых добровольцев, полученных из клинического центра. В ходе исследования было выполнено 11 аналитических циклов, в состав каждого из которых были включены калибровочные образцы, образцы контроля качества и исследуемые образцы от здоровых добровольцев. Относительная погрешность рассчитанных концентраций калибровочных образцов и образцов контроля качества в рамках каждого из аналитических циклов укладывалась в диапазон от -20,00 % до 20,00 % для концентраций, соответствующих НПКО, и в диапазон от -

15,00 % до 15,00 % – для остальных уровней концентраций. Результаты повторного выборочного анализа образцов составили 89,69 % для лаппаконитина и 86,60 % для N-дезацетиллаппаконитина (критерий приемлемости – не менее 67 %). Пример хроматограммы исследуемого образца от добровольца представлена на рисунке 14.

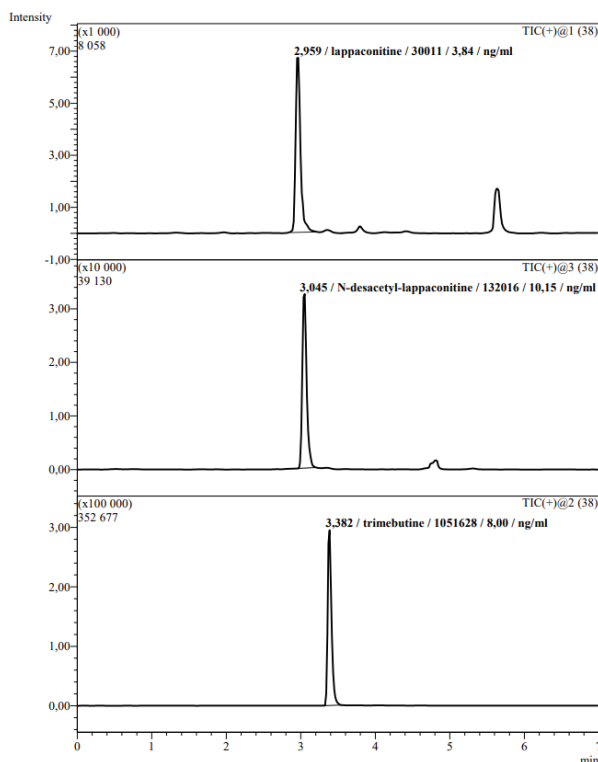


Рисунок 14 – Хроматограмма исследуемого образца от добровольца (рандомизационный номер добровольца 7, время отбора образца 2,5 ч.) (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

По полученным значениям концентраций испытуемых образцов от здоровых добровольцев были рассчитаны фармакокинетические параметры лаппаконитина (таблица 2) и N-дезацетиллаппаконитина (таблица 3).

Таблица 2 – Сводная таблица фармакокинетических параметров лаппаконитина после однократного приема натоцак исследуемого препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия)

Рассчитанные параметры	$C_{max}$ , нг/мл	$AUC_{0-t}$ , нг·ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , нг·ч/мл	$T_{max}$ , ч	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч
Количество добровольцев	28	28	22	28	22	22
Среднее арифметическое	5,09	42,96	71,24	4,43	0,114	8,45
Среднее геометрическое	4,06	33,18	58,42	3,37	0,097	7,17
Медиана	3,60	26,64	57,98	2,75	0,085	8,30
Стандартное отклонение	4,07	34,48	43,20	3,54	0,066	5,10

Таблица 3 – Сводная таблица фармакокинетических параметров N-дезацетиллаппаконитина после однократного приема натошак исследуемого препарата Аллафорте®

Рассчитанные параметры	$C_{max}$ , нг/мл	$AUC_{0-t}$ , нг·ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , нг·ч/мл	$T_{max}$ , ч	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч
Количество добровольцев	28	28	26	28	26	26
Среднее арифметическое	11,66	167,42	189,42	4,04	0,083	9,04
Среднее геометрическое	10,29	138,59	158,32	3,62	0,080	8,70
Медиана	9,88	133,28	154,35	4,00	0,079	8,77
Стандартное отклонение	6,21	114,41	125,20	2,18	0,024	2,57

Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах) лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина после приема исследуемого препарата приведены на рисунке 15.

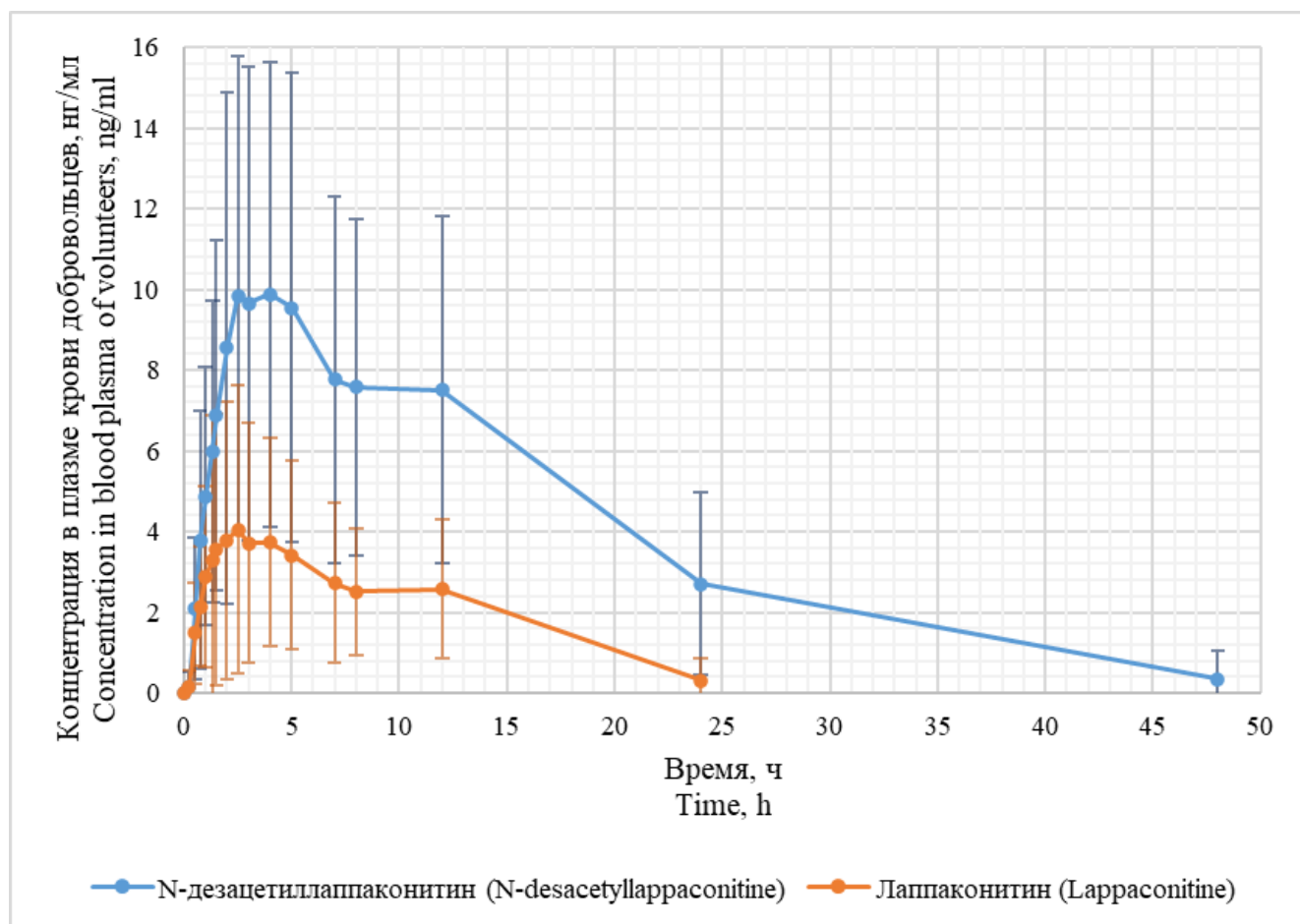


Рисунок 15 – Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах со стандартными отклонениями) лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина после однократного приема исследуемого препарата Аллафорте®, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия)

На рисунке 22 показано, что препарат Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) предположительно имеет двухфазную кинетику элиминации лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина, однако это может быть связано с высокой вариабельностью значений  $T_{max}$  лаптаконитина ( $CV = 79,84 \%$ ) и N-дезацетиллаптаконитина ( $CV = 53,94 \%$ ), а также большим разбросом индивидуальных значений (от 0,75 часов до 12 часов для лаптаконитина; от 1,5 часов до 12 часов для N-дезацетиллаптаконитина). Также можно отметить, что при приеме препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) отсутствуют существенные различия в  $T_{max}$  лаптаконитина и  $T_{max}$  N-дезацетиллаптаконитина (критерий Вилкоксона,  $p > 0,05$ ). Это может приводить к усилению терапевтического эффекта в момент достижения максимальных концентраций лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови пациентов. Площадь под фармакокинетической кривой N-дезацетиллаптаконитина в 3,9 раза выше, чем у лаптаконитина, что позволяет предположить низкую вероятность возникновения нежелательных явлений, поскольку N-дезацетиллаптаконитин обладает низкой токсичностью по сравнению с лаптаконитином.

Полученные результаты исследования фармакокинетики необходимо сопоставить с исследованиями фармакодинамики, что позволит скорректировать режим дозирования препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) [123]. Однако значения периода полувыведения лаптаконитина из полученных нами данных варьировались от 2,71 до 22,74 часов ( $CV = 60,39 \%$ ), поэтому необходимо обеспечить индивидуальный подход к выбору режима дозирования и при возможности проводить терапевтический лекарственный мониторинг при приеме препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) для обеспечения эффективной и безопасной терапии аритмий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведена разработка методики совместного определения лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека и в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (тройной квадруполь). Аналитические диапазоны для лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина были подобраны с использованием предложенного «оценочного» подхода и составили 0,50–50,00 нг/мл для лаптаконитина и 0,50–100,00 нг/мл для N-дезацетиллаптаконитина.

2. Проведен выбор биологической матрицы на основании данных оценки селективности, эффекта матрицы и степени извлечения, а также удобства работы с плазмой крови человека и

цельной кровью человека. В результате оценки селективности, эффекта матрицы и степени извлечения были получены результаты, которые соответствовали критериям приемлемости для каждой биологической матрицы. При сравнении вязкости и состава плазмы крови человека и цельной крови человека в качестве биологической матрицы была выбрана плазма крови человека.

3. Проведена полная валидация методики совместного определения лаппаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность (внутри циклов, между циклами), прецизионность (внутри циклов, между циклами), эффект матрицы, степень извлечения, перенос пробы, стабильность, отсутствие влияния разбавления образцов. Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости.

4. По разработанной и валидированной методике был произведен анализ образцов от здоровых добровольцев в клинического исследования препаратов лаппаконитина гидробромида. Полученные результаты калибровочных образцов и образцов контроля качества в рамках каждого из аналитических циклов соответствовали критериям приемлемости. Повторный выборочный анализ образцов, проведенный после анализа всех испытуемых образцов, также соответствовал критериям приемлемости.

5. Проведен расчет фармакокинетических параметров на основании полученных концентраций лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в образцах биологической матрицы здоровых добровольцев для лекарственного препарата Аллафорте<sup>®</sup>, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия). Установлено, что исследуемый лекарственный препарат по сравнению с аналогичными препаратами, зарегистрированными на территории Российской Федерации, имеет более длительные время достижения максимальной концентрации в крови ( $4,43 \pm 3,54$  часа) и период полувыведения лаппаконитина ( $8,45 \pm 5,10$  часа), что позволяет снизить кратность дозирования при терапии аритмий.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Арчакова, О. А.** Изучение фармакокинетики пролонгированного антиаритмического препарата лаппаконитина гидробромида (Аллафорте<sup>®</sup>, АО «Фармцентр Вилар», Россия) / **О. А. Арчакова**, Н. С. Багаева, Т. Н. Комаров, А. В. Рогов, Д. С. Щелгачева, А. В. Суворова, П. К. Карнакова, П. А. Карпова, И. Е. Шохин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 140–147.
2. **Арчакова, О. А.** Определение лаппаконитина, дитерпенового алкалоида, получаемого из растений *Aconitum leucostomum*, и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови человека и в цельной крови человека / **О. А. Арчакова**, Т. Н. Комаров, А. В. Рогов, Д. С. Щелгачева, А. В. Алешина, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 105–113.
3. **Арчакова, О. А.** Особенности проведения биоаналитических исследований препаратов лаппаконитина гидробромида / **О. А. Арчакова**, Т. Н. Комаров, Д. С. Щелгачева, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин // Сборник трудов X международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации». – Шымкент: Южно-Казахстанская медицинская академия, 2023. – С. 157–160.
4. **Арчакова, О. А.** Исследование фармакокинетики лекарственных средств, производных аконита белоустого (*Aconitum leucostomum Worosch*) и аконита северного (*Aconitum septentrionale Koelle*) / **О. А. Арчакова**, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, Н. С. Багаева // Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств». – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2023. – С. 162–165.
5. Карлина, М. В. Риск-ориентированный подход к созданию лекарственного препарата / М. В. Карлина, В. М. Косман, Р. А. Абрамович, **О. А. Арчакова**, Т. Н. Барыбина, Ю. В. Власенко, Л. С. Гузеватых, Е. Л. Ковалева, Т. Н. Комаров, А. В. Корель, Д. В. Кощиц, В. Р. Нягматуллина, Е. М. Петрова, Д. А. Рождественский, А. Ю. Романенко, А. В. Стрелкова, И. И. Тернинко, А. У. Тулегенова // Консультант GLP-PLANET 2023. Мнение фармацевтической отрасли: монография. – Санкт-Петербург: НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 2023. – С. 47–74.
6. **Арчакова, О. А.** Особенности разработки методики определения лаппаконитина и его активного метаболита в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / **О. А. Арчакова** // Сборник трудов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, 2023. – С. 171–174.

7. **Арчакова, О. А.** Биоаналитические аспекты изучения лекарственных средств с неустановленной фармакокинетикой и метаболизмом на примере препаратов лаппаконитина / **О. А. Арчакова**, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин // Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств». – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2022. – С. 21–25.

8. **Арчакова, О. А.** Биоаналитические исследования методом ВЭЖХ-МС: надлежащая и «ненадлежащая» практика / **О. А. Арчакова**, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин // Сборник тезисов III Международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке». – Москва: Российский университет дружбы народов, 2020. – С. 198–200.