

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»

На правах рукописи



Арчакова Ольга Александровна

**Разработка аналитических подходов к проведению исследований
фармакокинетики препаратов лаппаконитина**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Доктор фармацевтических наук,
Шохин Игорь Евгеньевич

Москва – 2024 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Общая характеристика аритмий	13
1.2 Фармакотерапия аритмий	17
1.3 Препараты лаппаконитина гидробромида	20
1.3.1 Доклинические исследования препаратов лаппаконитина	24
1.3.1.1 Изучение острой и хронической токсичности	24
1.3.1.2 Изучение биодоступности	25
1.3.2 Клинические исследования препаратов лаппаконитина	26
1.3.3 Литературный обзор биоаналитических методик определения лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина	27
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1 Материалы исследования	30
2.1.1 Стандартные растворы	30
2.1.2 Образцы биологической матрицы	31
2.1.3 Элюенты	32
2.1.4 Оборудование, используемое для хроматографического разделения и детектирования	33
2.1.5 Программное обеспечение, используемое для обработки полученных результатов	33
2.2 Методы исследования	34
2.2.1 Приготовление стандартных растворов	34
2.2.2 Пробоподготовка биологических образцов	37
2.2.3 Условия хроматографического разделения и детектирования	40
2.2.4 Приготовление элюентов	41
2.2.5 Фармакокинетический анализ полученных результатов	41
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2	42

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	44
3.1 Разработка методики.....	44
3.1.1 Подбор внутреннего стандарта.....	44
3.1.2 Разработка условий масс-спектрометрического детектирования	44
3.1.3 Разработка условий хроматографического разделения.....	50
3.1.4 Выбор аналитических диапазонов методики	52
3.2 Валидация методики.....	53
3.2.1 Валидация методики, плазма крови человека, этап 1.....	55
3.2.1.1 Градуировочная кривая.....	55
3.2.1.2 Селективность	60
3.2.1.3 Точность и прецизионность	63
3.2.1.4 Эффект матрицы.....	63
3.2.1.5 Степень извлечения.....	74
3.2.1.6 Перенос пробы.....	79
3.2.2 Валидация методики, цельная кровь человека, этап 1	79
3.2.2.1 Градуировочная кривая.....	79
3.2.2.2 Селективность	84
3.2.2.3 Точность и прецизионность	86
3.2.2.4 Эффект матрицы.....	86
3.2.2.5 Степень извлечения.....	91
3.2.2.6 Перенос пробы.....	93
3.2.3 Выбор биологической матрицы для последующего анализа	93
3.2.4 Валидация методики, плазма крови человека, этап 2.....	96
3.2.4.1 Градуировочная кривая.....	96
3.2.4.2 Точность и прецизионность	98
3.2.4.3 Стабильность	99
3.2.4.4 Отсутствие влияния разбавления образцов.....	102
3.3 Аналитический этап исследования	104
3.4 Фармакокинетический этап исследования	114
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	119

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	141

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных причин смертности во всем мире [1–8]. 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 [9, 10]. Одно из ведущих мест среди патологий сердечно-сосудистой системы и их последствий занимают нарушения сердечного ритма [8, 11].

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 [12, 13]. Ежегодная частота возникновения внезапной сердечной смерти варьирует от 0,36 до 1,28 случая на 1 тысячу населения [13]. Сердечная аритмия, характеризующаяся нерегулярными циклами сердцебиения, затрагивает более 33 миллионов человек, а также ложится тяжелыми бременем на системы здравоохранения многих стран. Желудочковая аритмия является причиной около 80 % внезапных сердечных приступов [14]. 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) [15–21].

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 [22]. 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 [23].

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 [24]. 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 [25, 26]. И поскольку фармакокинетика препаратов лаптаконитина изучена не в полной мере, то для обеспечения безопасности использования данных лекарственных средств возникает необходимость ее полноценного изучения [27].

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

В рецензируемых научных изданиях представлены немногочисленные методики определения лаптаконитина 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 лапаконитина гидробромида на основании протокола клинического исследования, утвержденного Минздравом России.

5. Рассчитать фармакокинетические параметры на основании полученных концентраций лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в образцах биологической матрицы здоровых добровольцев в рамках проведения клинического исследования лекарственного препарата Аллафорте[®], 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 лаптаконитина гидробромида, в том числе представлен поход к выбору биологической матрицы и аналитического диапазона для проведения данного исследования. Впервые произведен расчет основных фармакокинетических параметров лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в рамках клинических испытаний лекарственных препаратов на основе лаптаконитина гидробромида. Разработанная методика может быть впоследствии применена для исследований фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов лаптаконитина в различных дозировках.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе представлены подходы к разработке и валидации методики совместного определения лаптаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина 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[®], 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 лаппаконитина 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 лаппаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

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

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

4. Результаты проведения фармакокинетического исследования в виде фармакокинетических профилей и фармакокинетических параметров для лекарственного препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), полученные в рамках проведения аналитического этапа исследования сравнительной фармакокинетики препарата Аллафорте[®], 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 лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика аритмий

Каждое сердечное сокращение возникает как электрический импульс, обусловленный периодическими изменениями трансмембранного градиента концентраций ионов Na^+ , Ca^{2+} , K^+ и Mg^{2+} , в синоатриальном узле, располагающемся в правом предсердии [28]. Импульс сначала вызывает сокращение обоих предсердий, затем активацию атриовентрикулярного узла, и через пучок Гисса и волокна Пуркинье электрический импульс распространяется через оба желудочка, вызывая их синхронное сокращение [29].

Нарушения распределения вышеперечисленных катионов между межклеточной жидкостью и цитозолем кардиомиоцитов приводят к изменениям электрической активности сердца, что проявляется нарушениями ритма сердечной деятельности [28, 30, 31]. Так, например, ионы Na^+ и Ca^{2+} в аритмогенных концентрациях могут накапливаться в цитозоле кардиомиоцитов при нарушении функции Na^+/K^+ -АТФазы и энергозависимых Ca^{2+} (АТФ)-каналов сарколеммы, а также при повышении проницаемости плазматических мембран при свободно радикальном повреждении билипидного слоя мембран, наблюдающемся при феномене ишемии/реперфузии миокарда [32]. В свою очередь экстрасистолическое увеличение внутриклеточного Ca^{2+} приводит к отсроченной постдеполяризации и эктопической активности [33, 34].

В случаях грубых нарушений барьерной и распределительной функций клеточных мембран могут возникать необратимые изменения электрических свойств кардиомиоцитов и полное нарушение функционирования всего сердца, несовместимое с жизнью. Следовательно, в патогенетическом отношении аритмии являются следствием нарушения катионтранспортной функции клеточных мембран и развития внутриклеточного ионного дисбаланса, которое приводит к нарушению нормальной сократительной деятельности сердца [11, 28].

Мышечные волокна сердца обладают следующими свойствами: автоматизмом (способностью кардиомиоцитов, «пейсмейкеров», спонтанно генерировать импульс), возбудимостью (способностью кардиомиоцитов воспринимать сигнал и реагировать на него), проводимостью (способностью распространения импульса по проводящей системе сердца) и сократимостью (способностью сокращаться в ответ на полученный сигнал). То есть миокард генерирует электрические импульсы, которые распространяются по проводящей системе сердца, возбуждают мышечные волокна и вызывают их сокращение [35]. Нарушение формирования импульса возбуждения, расстройство его проведения, нарушение связи и последовательности в активации предсердий и желудочков вызывают возникновение аритмий в организме человека [36, 37].

Экспертной группой ВОЗ была разработана и опубликована классификация аритмий, которая разделяет данное нарушение ритма сердца в зависимости от места образования импульса (например, синусовые, предсердные), от последовательности возникновения импульсов, от частоты импульсации, от характера проведения импульса и по другим параметрам. Однако в настоящее время широкое распространение получила классификация аритмий, основанная на патогенезе ритма сердца (таблица 1) [36, 38].

Таблица 1 – Классификация аритмий

Группа	Подгруппа	Вид аритмии
Аритмии, обусловленные нарушением образования импульса	Номотропные аритмии	Синусовая тахикардия
		Синусовая брадикардия
		Синусовая аритмия
		Миграция источника ритма
	Гетеротропные аритмии	Экстрасистолия
		Пароксизмальная тахикардия
		Непароксизмальная тахикардия и ускоренные эктопические ритмы
		Трепетание предсердий
		Фибрилляция предсердий

Продолжение Таблицы 1

Группа	Подгруппа	Вид аритмии
		Трепетание и фибрилляция желудочков
Аритмии, обусловленные нарушением проводимости импульса	—	Синоатриальная блокада
		Предсердная блокада
		Атриовентрикулярная блокада
		Внежелудочковые блокады
		Асистолия желудочков
Комбинированные аритмии и аритмические синдромы	—	Синдром слабости синусового узла
		Синдром преждевременного возбуждения желудочков
		Парасистолия
		Ускользящие (выскакивающие) сокращения и ритмы
		Синдром удлиненного интервала $Q-T$
		Синдром укороченного интервала $Q-T$
		Синдром Брудага

В настоящее время выделяют множество причин возникновения аритмий, которые можно разделить на три основные группы:

- 1) кардиальные, связанные с патологиями сердечно-сосудистой системы (например, инфаркт миокарда, врожденные пороки сердца, ишемическая болезнь сердца);
- 2) экстракардиальные, возникающие в результате патологии других органов и систем, физических и психоэмоциональных нагрузок, а также обусловленные приемом некоторых лекарственных препаратов (например, антиаритмических лекарственных препаратов, симпатомиметиков, психотропных и антимикробных лекарственных препаратов) токсическим воздействием на организм человека и различными электролитными нарушениями;
- 3) идиопатические, возникшие в результате неидентифицированной патологии [35, 39–41].

Одной из причин возникновения аритмий являются вирусные инфекции. Существует более 20 вирусов, которые участвуют в воспалении миокарда, наиболее распространенными являются парвовирус В19, вирус герпеса человека 6, аденовирус и вирус Коксаки В3. Воспаление миокарда, вызванное вирусной инфекцией, приводит к дисфункции ионных каналов или электрофизиологическому и структурному ремоделированию как механизму аритмии [42]. Также есть данные о том, что новая коронавирусная инфекция SARS-CoV-2 играет важную роль в возникновении осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, в частности аритмии [43].

Аритмия является распространенным заболеванием во всем мире, и в частности, на территории Российской Федерации. Согласно литературным данным, частота возникновения синусовой аритмии составляет 33,9–34,5 %, синусовой брадикардии – 7,1–12,8 %, синусовой тахикардии – 4,9–9,8 % [2].

Одной из распространенных форм нарушений ритма сердца является фибрилляция предсердий, которая характеризуется быстрой, нерегулярной и хаотичной предсердной активностью с последующим ухудшением механической функции предсердий [3, 37, 44, 45]. Распространенность данной патологии составляет 2 % в общей популяции и выявляется у 3,8 % пациентов старше 60 лет и у 9 % пациентов старше 80 лет [44].

Аритмии часто диагностируются в совокупности с сочетанными патологиями и могут приводить к другим сердечно-сосудистым заболеваниям, иногда приводя к сердечной недостаточности или внезапной 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 [12, 46]. В связи с этим аритмии классифицируют на доброкачественные (не влияют на жизненный прогноз), потенциально злокачественные (отягощают жизненный прогноз) и злокачественные (угрожают жизни), на основании которых формируются цели и методы последующей терапии [36].

1.2 Фармакотерапия аритмий

Терапия нарушений ритма сердца включает в себя мероприятия, направленные на улучшение прогноза пациента. При этом используется антикоагулянтная терапия, коррекция сердечно-сосудистой патологии, а также терапия, направленная на уменьшение проявления симптомов болезни [44].

Несмотря на успешное внедрение в клиническую практику современных высокотехнологичных методов лечения, основным и широко используемым методом коррекции нарушений ритма сердца является фармакотерапия [31, 47]. Медикаментозное лечение нарушений ритма сердца требует понимания механизмов возникновения аритмий, их клинических проявлений и возможных последствий, знания клинической фармакологии антиаритмических препаратов. Последнее включает в себя действие препаратов на электрофизиологические свойства нормальных и патологически измененных тканей сердца, на свойства миокарда и тонус сосудов, взаимодействие препаратов с автономной нервной системой и их влияние на другие органы и системы, и наконец, представления об их побочных эффектах и потенциальном взаимодействии с другими препаратами [1].

Согласно классификации V. Williams, которая впоследствии была модифицирована D. Harrison, все антиаритмические препараты подразделяются на 4 класса, представленных в таблице 2 [1, 22, 31, 48, 49].

Таблица 2 – Классификация антиаритмических препаратов

Классы	Подклассы и группы, примеры лекарственных средств
1 – модуляторы функций ионных каналов	1.1 – блокаторы натриевых каналов 1А – блокаторы каналов со средней кинетикой (например, новокаинамид) 1В – блокаторы каналов с быстрой кинетикой (например, лидокаин) 1С – блокаторы каналов с медленной кинетикой (например, флекаинид, этацизин)

Продолжение Таблицы 2

Классы	Подклассы и группы, примеры лекарственных средств
	1.2 – блокаторы медленных кальциевых каналов (например, верапамил, дилтиазем)
	1.3 – блокаторы калиевых каналов (например, амиодарон, соталол)
2 – модуляторы рецепторов сердца	2.1 – модуляторы адренергических рецепторов
	2.1.1 – блокаторы β -адренергических рецепторов (например, пропранолол)
	2.1.2 – активаторы β -адренергических рецепторов (например, изадрин)
	2.2 – активаторы пуринергических рецепторов (например, аденозин)
	2.3 – блокаторы мускариновых рецепторов (например, атропин)
3 – модуляторы функций ионных насосов	3.1 – ингибиторы Na^+ , K^+ -АТФазы (сердечные гликозиды)
	3.2 – активаторы Na^+ , K^+ -АТФазы (например, сульфат магния)
	3.3 – активаторы Ca^{2+} -АТФазы (например, креатининфосфат)
4 – мембранопротекторные средства	Например, ритмокор

Нередко антиаритмические препараты обладают узким терапевтическим диапазоном, высокой токсичностью, а также проявляют большое количество нежелательных явлений [50]. Поэтому при терапии антиаритмическими препаратами необходимо основываться на достижении максимально высокой антиаритмической эффективности в сочетании с низким риском развития нежелательных явлений, в том числе желудочковой проаритмии [32]. Так, например, при применении антиаритмических препаратов регистрируется следующая динамика возникновения проаритмогенных эффектов:

- 1) антиаритмические препараты 1А класса – 5–8 %;
- 2) антиаритмические препараты 1В класса – 7–19 %;
- 3) антиаритмические препараты 1С класса – 12–20 %;
- 4) блокаторы калиевых каналов – около 5 %;

5) блокаторы β -адренергических рецепторов – около 9 % [1, 51].

Также отмечается высокая вероятность возникновения экстракардиальных нежелательных явлений. Например, амиодарон вызывает нежелательные реакции со стороны щитовидной железы и легких [32].

Антиаритмические препараты IC класса являются средствами первой линии для противорецидивного лечения фибрилляции предсердий, замедляющими прогрессию от пароксизмальной к постоянной форме данной аритмии. Однако на основании многоцентровых клинических исследований было доказано, что данные лекарственные средства способны увеличивать смертность в группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда и страдающих сердечной недостаточностью, что ограничивает их применение [6, 32, 49, 52]. И поскольку в настоящее время в клинической практике на территории Российской Федерации выбор необходимого антиаритмического препарата IC класса осуществляется эмпирически, исходя из предпочтений и опыта врача, то недостаточная изученность выбранного лекарственного средства может привести к снижению эффективности и безопасности терапии [53].

На территории Российской Федерации уже много лет для лечения наджелудочковых и желудочковых аритмий применяются препараты лапаконитина [49], антиаритмическая эффективность которых достигает 90 % в течение первых трех месяцев наблюдений, а к концу первого года они позволяют сохранить сердечный ритм в 57 % случаев при относительно хорошей переносимости [54]. Согласно статистике, для контроля ритма сердца препараты лапаконитина назначаются в следующих случаях:

- в 8,9 % случаев как препарат 1-й линии пациентам без органического заболевания сердца или с минимальными структурными изменениями;
- в 19,7 % случаев как препарат 2-й линии пациентам без органического заболевания сердца или с минимальными структурными изменениями;
- в 1,8 % случаев как препарат 1-й линии при лечении пароксизмальной и персистирующей фибрилляцией предсердий у пациентов с органическим

заболеванием сердца в отсутствие клинически значимой хронической сердечной недостаточности;

– в 4,0 % случаев как препарат 2-й линии при лечении пароксизмальной и персистирующей фибрилляцией предсердий у пациентов с органическим заболеванием сердца в отсутствие клинически значимой хронической сердечной недостаточности;

– в 5,2 % случаев после изоляции устьев легочных вен [55].

Важной проблемой при фармакотерапии аритмий препаратами лаптаконитина гидробромида, который является антиаритмическим препаратом 1С класса, являются достаточно часто развивающиеся неприятные субъективные ощущения (головокружение, головная боль, тяжесть в голове, атаксия, диплопия), снижающие работоспособность и приводящие к отказу от терапии. Минимизировать подобные симптомы при использовании лаптаконитина гидробромида призвана разработанная в России его новая лекарственная форма пролонгированного действия – Аллафорте® (АО «Фармцентр ВИЛАР») [5, 32, 52, 56–59]. Разработка данной лекарственной формы пролонгированного действия направлена на применение данного лекарственного препарата пациентами с меньшей кратностью приемов в сутки и обеспечение удобства его использования при длительной терапии. Также отмечается, что несмотря на пролонгированное действие Аллафорте® (АО «Фармцентр ВИЛАР»), данный лекарственный препарат обладает не меньшим антиаритмическим действием, а также не приводит к усилению отрицательного влияния на проводящую систему сердца в сравнении с обычной лекарственной формой, в том числе при режиме дозирования 2 раза в сутки [52].

1.3 Препараты лаптаконитина гидробромида

Лаптаконитин ((1,14,16)-20-этил-1,14,16-триметоксиаконитан-4,8,9-триол-4-(2-(ацетиламино)бензоат) – С18-дитерпеновый алкалоид, получаемый из растений, принадлежащих к роду Аконит (*Aconitum*) семейства Лютиковые [60–

63]. В качестве сырья для производства антиаритмического препарата пролонгированного действия Аллафорте® (АО «Фармцентр ВИЛАР») используются надземная часть аконита белоустого (*Aconitum leucostomum* Worosch.) и корневища с корнями аконита северного (*Aconitum septentrionale* Koelle) семейства лютиковые (*Ranunculaceae*) [64–66]. Структурная формула лаптаконитина приведена на рисунке 1.

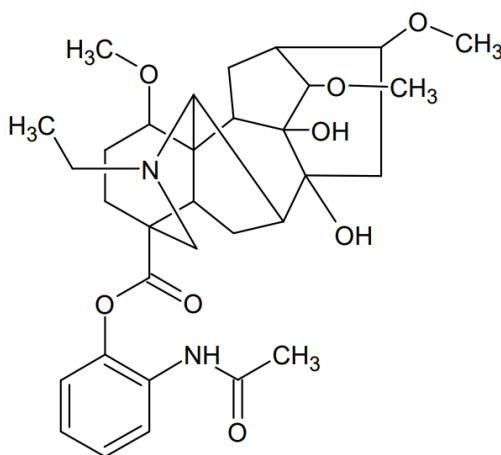


Рисунок 1 – Структурная формула лаптаконитина

Исследования показывают, что лаптаконитин в процессе метаболизма в организме человека образует 51 метаболит. При этом основными метаболическими путями являются N-деэтилирование, O-деметиление, гидролиз и гидроксирование [24, 49, 60, 67–69]. Основным метаболитом, обладающим выраженными антиаритмическими свойствами, является N-деацетиллаптаконитин. Отмечается, что данный метаболит является менее токсичным, обладает большей терапевтической широтой в сравнении с лаптаконитином [70]. Структурная формула N-деацетиллаптаконитина представлена на рисунке 2.

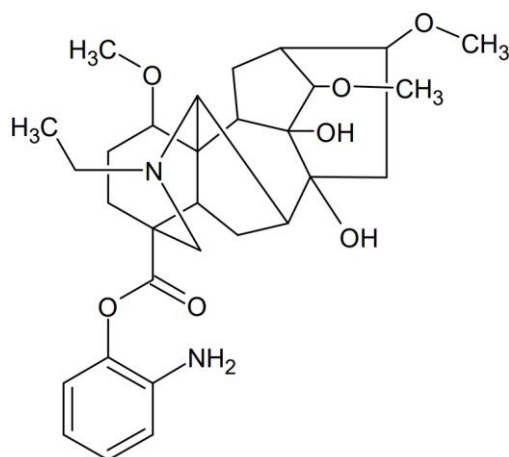


Рисунок 2 – Структурная формула N-дезацетиллаппаконитина

Литературные источники отмечают, что лаппаконитин обладает широким спектром фармакологических активностей: вещество оказывает на организм человека антиаритмическое, обезболивающее, противовоспалительное, противоревматическое, антиоксидантное, противоопухолевое, иммуномодулирующее и антибактериальное действие [60, 71–75].

Авторы многих статей подчеркивают высокое обезболивающее действие лаппаконитина, сравнимое с действием опиоидных анальгетиков. Однако подчеркивается, что при приеме лаппаконитина не наблюдается таких нежелательных явлений как угнетение дыхания, аддиктивность, характерные при приеме опиоидных анальгетиков, а также поражение слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, характерное при приеме нестероидных противовоспалительных лекарственных средств [60]. В связи с этим препараты лаппаконитина активно используются в китайской медицине в качестве терапии легких или умеренных острых и хронических болей [60, 63, 76–80]. Механизмы, лежащие в основе анальгезии лаппаконитином, сложны и дискуссионны. Сообщалось, что в антиноцицептивном эффекте может участвовать активация центральной норадренергической и серотонинергической систем. Снижение концентрации норадреналина и повреждение серотонинергических нейронов центральной нервной системы подавляли анальгетическую активность лаппаконитина [77].

Отмечается антибактериальная активность в отношении синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) и сальмонелл (*Salmonella Typhi*) [60]. Также в статьях приводятся исследования противоопухолевой активности в отношении колотерального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака шейки матки [75, 81, 82].

В конце 80-х годов прошлого века на отечественном рынке появился антиаритмический препарат, действующим веществом которого является алкалоид лаппаконитина гидробромид [83]. Данное лекарственное средство относится к препаратам 1С класса, и его фармакологический эффект основан на блокаде натриевых каналов, что приводит к угнетению скорости деполяризации, и в результате чего происходит значительное замедление проведения импульса и снижение возбудимости в системе Гиса-Пуркинье, миокарде предсердий и желудочков [1, 47, 83]. Отмечается, что препараты лаппаконитина гидробромида являются высокоэффективным средством лечения больных с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий, желудочковой экстрасистолией и тахисистолическими аритмиями [68]. На сегодняшний день на территории Российской Федерации препараты лаппаконитина гидробромида также включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов [84–88].

Поскольку препараты лаппаконитина гидробромида относятся к антиаритмическим препаратам 1С класса, они имеют наиболее выраженное замедление скорости деполяризации по сравнению с блокаторами натриевых каналов других подклассов [49]. Однако лаппаконитин имеет малую широту терапевтического действия, вследствие чего возможно развитие тяжелой интоксикации [22, 89]. Выраженные и довольно частые нежелательные явления со стороны центральной нервной системы (головокружения, головная боль, атаксия, диплопия), а также со стороны сердечно-сосудистой системы (нарушения предсердной и желудочковой проводимости, функции синусового узла, артериальная гипотензия) значительно ограничивают его применение [83, 89].

Развитие нежелательных эффектов приблизительно в 25 % случаев не позволяет достичь терапевтической дозы препарата [83].

Препараты лаппаконитина гидробромида не зарегистрированы в странах Западной Европы и Америке, поэтому препарат не включен в публикуемые международные рекомендации, обзоры и метаанализы. Официальная инструкция к нему отличается лаконичностью, что серьезно затрудняет принятие решения о возможном назначении препарата у отдельных групп пациентов [89].

1.3.1 Доклинические исследования препаратов лаппаконитина

1.3.1.1 Изучение острой и хронической токсичности

В рамках доклинических исследований было проведено изучение острой и хронической токсичности лекарственного препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 50 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») (испытуемый препарат) в сравнении с лекарственным препаратом Аллапинин[®], таблетки 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») (препарат сравнения) [66].

При проведении опытов острой токсичности на белых мышах (внутрижелудочное введение) было выявлено, что животные одинаково удовлетворительно переносят дозу 0,5 мг/мышь (30 мг/кг) как испытуемого препарата, так и препарата сравнения, а величина ЛД₅₀ (доза вещества, вызывающая гибель 50 % испытуемых животных [90]) для испытуемого препарата и препарата сравнения составляла более 1 мг/мышь (60 мг/кг). На основании полученных данных, согласно Патенту № RU2664668C1 [66], лекарственный препарат Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 50 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР»), также как и лекарственный препарат Аллапинин[®], таблетки 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») был определен к V классу «Практически нетоксично» по Классификации токсичности по Hodge и Sterner (1943 г.) [66, 91].

При проведении опытов острой и хронической токсичности использовались белые крысы обоего пола (внутрижелудочное введение). При этом в опытах острой токсичности было выявлено, что животные одинаково удовлетворительно переносят дозу 16 мг/кг как испытуемого препарата, так и препарата сравнения. При этом последующее наблюдение за внешним видом, состоянием шерстяного покрова, слизистых оболочек, характером выделений, поведенческими реакциями и приростом массы тела крыс не выявило никаких отклонений. При изучении хронической токсичности при введении доз 1 мг/кг и 5 мг/кг как испытуемого препарата, так и препарата сравнения не было выявлено отклонений двигательной активности, изменений состояния кожных покровов, слизистых оболочек и шерсти, массы тела животных в сравнении с контрольной группой. Также отмечено, что при оценке детоксицирующей функции печени после курса введения испытуемого препарата и препарата сравнения длительность «гексеналового сна» у животных не отличалась в сравнении с соответствующими величинами в контрольной группе [66].

1.3.1.2 Изучение биодоступности

В рамках доклинических исследований было проведено изучение биодоступности лекарственного препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 50 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») (испытуемый препарат) в сравнении с лекарственным препаратом Аллапинин[®], таблетки 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») (препарат сравнения) на кроликах. При этом были выявлено, что при приеме испытуемого препарата наблюдались более низкие значения C_{\max} (приблизительно в 2,4 раза) и более высокие значения T_{\max} (приблизительно в 5 раз), чем при приеме препарата сравнения. Также наблюдались незначительные различия в $T_{1/2}$ при приеме обоих препаратов. На основании данного исследования было установлено, что испытуемый лекарственный препарат может рассматриваться как препарат пролонгированного действия [66].

1.3.2 Клинические исследования препаратов лаптаконитина

Несмотря на то, что препараты лаптаконитина гидробромида существуют на отечественном фармацевтическом рынке уже несколько десятков лет, данное лекарственное средство остается недостаточно изученным. Отсутствуют данные о проведении проспективных исследований, в которых препараты лаптаконитина принимали бы более 100 пациентов с фибрилляцией предсердий, а всего более чем за 30 лет в 10 исследованиях чуть более 400 пациентов с фибрилляцией предсердий принимали данное лекарственное средство, при этом лаптаконитин сравнивался с препаратами, которые в настоящее время не входят в перечень рекомендованных для терапии фибрилляции предсердий. Только одно исследование было рандомизированным, но в нем участвовали только мужчины моложе 60 лет, число пациентов было малым, а лаптаконитин в нем сравнивался с хинидином, который в настоящее время в клинической практике не используется как средство для поддержания синусового ритма [92].

Поскольку крупных многоцентровых рандомизированных плацебо-контролируемых исследований по использованию препаратов лаптаконитина пока не проводилось, данные о его эффективности и безопасности сильно ограничены [22, 83, 89]. В немногочисленных клинических работах показана антиаритмическая эффективность препарата при лечении желудочковой экстрасистолии и при профилактике рецидивов фибрилляции предсердий у больных без выраженных органических изменений сердца. Препарат может быть использован при профилактике тахиаритмий у больных с синдромом Вольфа-Паркинсона-Уайта, а также при наличии умеренной брадикардии [83].

С позиций современной доказательной медицины оправданным является назначение только тех лекарственных средств, которые доказали не только свою эффективность, но и высокую безопасность по результатам многоцентровых клинических исследований. Таким образом, авторы многих статей подчеркивают, что отсутствие доказательной базы не позволяет в должной мере прогнозировать

безопасность лапаконитина в различных клинических ситуациях, что делает его препаратом резерва [83, 89, 92].

1.3.3 Литературный обзор биоаналитических методик определения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина

На момент проведения экспериментальной части работы в доступных литературных источниках были представлены немногочисленные методики определения лапаконитина в биологических матрицах животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием в сочетании с пробоподготовкой осаждением ацетонитрилом, жидкость-жидкостной экстракцией и твердофазной экстракцией (таблица 3) [93–95].

Таблица 3 – Методики определения лапаконитина в биологических матрицах

Аналитический метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Аналитический диапазон	Ссылка
ВЭЖХ-МС/МС	Цельная кровь мышей	Осаждение ацетонитрилом	0,100–500,000 нг/мл	[93]
ВЭЖХ-МС/МС	Плазма крови кроликов	ЖЖЭ	13,125–1050,000 нг/мл	[94]
ВЭЖХ-МС/МС	Плазма крови крыс	ТФЭ	5,000–1000,00 нг/мл	[95]

Как показано в таблице 3, в настоящий момент в литературных источниках отсутствуют данные по совместному определению лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина в биологических матрицах человека. В связи с этим было принято решение разработать и валидировать методику определения данных веществ в плазме крови и в цельной крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, который в настоящее время является методом выбора при изучении фармакокинетики химико-фармацевтических лекарственных средств [96–100].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Проведен обзор литературных данных, описывающих эпидемиологию, механизмы развития и классификацию аритмий. Установлено, что нарушение сердечного ритма является распространенным заболеванием во всем мире, и в частности, на территории Российской Федерации, а частота возникновения синусовой аритмии составляет 33,9–34,5 %, синусовой брадикардии – 7,1–12,8 %, синусовой тахикардии – 4,9–9,8 %. Поскольку аритмии часто диагностируются в совокупности с сочетанными патологиями и могут приводить к другим сердечно-сосудистым заболеваниям, является актуальным изучение фармакотерапии данной патологии.

2. На территории Российской Федерации уже много лет для терапии наджелудочковых и желудочковых аритмий применяются препараты лаптаконитина гидробромида, которые обладают высокой антиаритмической активностью. Важной проблемой при фармакотерапии нарушений ритма сердца данными лекарственными препаратами являются достаточно часто развивающиеся неприятные субъективные ощущения, снижающие работоспособность и приводящие к отказу от терапии.

3. Проведено изучение метаболизма, доклинических и клинических исследований препаратов лаптаконитина гидробромида на основании опубликованных литературных данных. Установлено, что в процессе метаболизма данных лекарственных средств в организме человека образуется N-дезацетиллаптаконитин, который также обладает выраженной антиаритмической активностью. При этом отсутствуют данные об изучении фармакокинетики препаратов лаптаконитина гидробромида в рамках клинических исследований, что ограничивает его применение при терапии аритмий.

4. Проведен поиск опубликованных методик определения лаптаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина в биологических матрицах. Установлено, что в литературных источниках представлены немногочисленные методики определения лаптаконитина 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.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Стандартные растворы

Приготовление стандартных растворов лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и тримебутина (внутренний стандарт) проводили с использованием следующих стандартных образцов, субстанций и реактивов:

- 1) субстанция лаппаконитина гидробромида, производитель АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия, серия 250219, количественное содержание 100,07 %;
- 2) субстанция N-дезацетиллаппаконитина, производитель АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия, серия LGM-13, количественное содержание 99,37 %;
- 3) стандартный образец тримебутина, производитель LGC, Великобритания, серия № G1025064, количественное содержание 99,37 %;
- 4) метанол, класс «UHPLC-grade», производитель J.T. Baker, Нидерланды.

Хранение стандартных образцов лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и тримебутина осуществлялось в холодильнике фармацевтическом, производитель LIEBHERR, Германия.

Приготовление стандартных растворов лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и тримебутина проводили с использованием следующего оборудования и мерной посуды:

- 1) весы аналитические, класс точности Специальный – I (ГОСТ 24104-01), производитель GR-200, A&D Company Ltd., Япония;
- 2) дозатор переменного объема одноканальный «Блэк» 500–5000 мкл, производитель АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия;
- 3) дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 100–1000 мкл, производитель АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия;
- 4) дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 10–100 мкл, производитель АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия;

5) колбы мерные класса А вместимостью 5,000 мл, 10,000 мл, 20,00 мл, 25,00 мл, 50,00 мл, 100,0 мл.

Хранение стандартных растворов анализируемых осуществляли в морозильнике микропроцессорном для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов ММ-180/20/35, производитель АО «ПОЗИС», Россия.

2.1.2 Образцы биологической матрицы

Клиническим центром были предоставлены биологические образцы от здоровых добровольцев, принимавших участие в клиническом исследовании препаратов лаппаконитина на основании протокола клинического исследования, утвержденного Минздравом России. В качестве антикоагулянта для отбора образцов плазмы крови здоровых добровольцев использовался K_2 ЭДТА.

Приготовление модельных образцов плазмы крови и цельной крови, а также интактных образцов плазмы крови и цельной крови проводили с использованием следующих видов биологической матрицы:

- 1) интактная плазма крови здоровых добровольцев, полученная из шести независимых источников, с добавлением K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта;
- 2) гиперлипидемическая интактная плазма крови с добавлением K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта;
- 3) гемолизная интактная плазма крови с добавлением K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта;
- 4) интактная цельная кровь здоровых добровольцев, полученная из шести независимых источников, с добавлением K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Антикоагулянт K_2 ЭДТА был использован в образцах интактной биологической матрицы согласно Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.).

Отбор биологических образцов осуществлялся в соответствии с этическими принципами Хельсинкской Декларации, Всемирной Медицинской Ассоциации, стандартами по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP), а также Конституцией РФ.

Приготовление модельных образцов плазмы крови и цельной крови, бланковых образцов плазмы крови и цельной крови, а также образцов плазмы крови от добровольцев проводили с использованием следующих реактивов:

1) ацетонитрил, класс «LC-MS grade», производитель Biosolve, Франция.

Приготовление модельных образцов, бланковых образцов, а также образцов плазмы крови добровольцев проводилось с использованием следующего оборудования:

1) дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 100–1000 мкл, производитель АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия;

2) дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 10–100 мкл, производитель АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия (применимо только для модельных образцов);

3) механический степпер HandyStep® S, производитель BRAND, Германия;

4) вортекс-шейкер, производитель Heidolph ReaxTop, Германия;

5) центрифуги медицинские CM-50M, производитель СИА «ЭЛМИ», Латвия.

Хранение образцов интактной плазмы крови, гиперлипидемической интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы крови, плазмы крови добровольцев осуществлялось в морозильнике микропроцессорном для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов MM-180/20/35, производитель АО «ПОЗИС», Россия.

2.1.3 Элюенты

Приготовление элюентов проводилось с использованием следующих реактивы:

1) вода Milli-Q;

- 2) метанол, класс «UHPLC-grade», производитель J.T. Baker, Нидерланды;
- 3) муравьиная кислота, класс «98 % pure», производитель PanReac, Германия;
- 4) аммиак водный, класс «for analysis», производитель PanReac, Германия.

Приготовление элюентов осуществлялось с использованием следующего оборудования и мерной посуды:

- 1) дозатор переменного объема одноканальный «Техно» 100–1000 мкл, производитель АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия;
- 2) колбы мерные класса А вместимостью 1000,0 мл.

2.1.4 Оборудование, используемое для хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение и детектирование лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и тримебутина проводилось с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Nexera XR, оснащенный двумя насосами высокого давления LC-20ADXR, дегазатором DGU-20A3R, термостатом колонок CTO-20A, автосамплером SIL-20ACXR, УФ-спектрофотометрическим детектором SPD-20AUFLC, в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь) (Shimadzu Corporation, Япония).

В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографическая колонка YMC-Pack Pro C18, 100x2,0 мм, 3 мкм (YMC CO., LTD., Япония).

2.1.5 Программное обеспечение, используемое для обработки полученных результатов

Обработка первичных данных, полученных с хроматографа, проводилась с использованием программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония. Расчеты в рамках валидационного и аналитического этапов исследования проводились с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, США.

Вычисление фармакокинетических параметров проводилось с помощью программного обеспечения R Project 3.5.1 (расширение «bear», версия 2.8.3-2), разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Приготовление стандартных растворов

Приготовление исходного стандартного раствора лаппаконитина. 11,4 мг (что соответствует 10,0 мг лаппаконитина с учетом количественного содержания в пересчете на основание) субстанции лаппаконитина гидробромида количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и растворяли в ~50 мл метанола, встряхивали до полного растворения вещества. Далее доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Концентрация лаппаконитина в растворе составила 100,00 мкг/мл.

Приготовление промежуточного стандартного раствора лаппаконитина. 500 мкл исходного стандартного раствора лаппаконитина с концентрацией 100,00 мкг/мл переносили в мерную колбу вместимостью 25,00 мл, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Концентрация лаппаконитина в растворе составила 2000,00 нг/мл.

Приготовление исходного стандартного раствора N-дезацетиллаппаконитина. 10,1 мг (что соответствует 10,0 мг N-дезацетиллаппаконитина с учетом количественного содержания) субстанции N-дезацетиллаппаконитина количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и растворяли в ~50 мл метанола, встряхивали до полного растворения вещества. Далее доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Концентрация N-дезацетиллаппаконитина в растворе составила 100,00 мкг/мл.

Приготовление промежуточного стандартного раствора N-дезацетиллаппаконитина. 1000 мкл исходного стандартного раствора N-

дезацетиллаппаконитина с концентрацией 100,00 мкг/мл переносили в мерную колбу вместимостью 25,00 мл, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Концентрация N-дезацетиллаппаконитина в растворе составила 4000,00 нг/мл.

Приготовление смешанных рабочих стандартных растворов лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина. Смешанные рабочие стандартные растворы лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина готовили путём разведения исходных стандартных растворов и промежуточных стандартных растворов. Аликвоты промежуточных стандартных растворов лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина помещали в мерные колбы, далее объём растворов доводили до метки метанолом и перемешивали (таблица 4, таблица 5).

Таблица 4 – Приготовление смешанных рабочих стандартных растворов лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина (серия растворов № 1)

№ раствора	Концентрация, нг/мл		Объём мерной колбы, мл	Объём исходного стандартного раствора, мкл		Объём промежуточного стандартного раствора, мкл	
	ЛАП	ДЕЗ		ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
1	20,00	20,00	10,000	-	-	100	50
2	200,00	200,00	20,00	-	-	2000	1000
3	1000,00	1000,00	20,00	200	200	-	-
4	2000,00	2000,00	25,00	500	500	-	-
5	6000,00	6000,00	10,000	600	600	-	-
6	10000,00	10000,00	10,000	1000	1000	-	-
7	15000,00	15000,00	10,000	1500	1500	-	-
8	20000,00	20000,00	5,000	1000	1000	-	-

Таблица 5 – Приготовление смешанных рабочих стандартных растворов лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина (серия растворов № 2)

№ раствора	Концентрация, нг/мл		Объём мерной колбы, мл	Объём промежуточного стандартного раствора, мкл	
	ЛАП	ДЕЗ		ЛАП	ДЕЗ
1	10,00	10,00	10,000	50	25
2	20,00	20,00	20,00	200	100
3	60,00	100,00	20,00	600	500
4	180,00	200,00	25,00	2250	1250
5	300,00	500,00	10,000	1500	1250
6	500,00	1000,00	10,000	2500	2500
7	700,00	1500,00	10,000	3500	3750
8	1000,00	2000,00	5,000	2500	2500
9	30,00	30,00	20,00	300	0150
10	300,00	600,00	10,000	1500	1500
11	800,00	1600,00	5,000	2000	2000
12	60,00	60,00	20,00	600	300
13	1600,00	3200,00	10,000	8000	8000

Приготовление исходного стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина. 10,1 мг (что соответствует 10,0 мг тримебутина с учетом количественного содержания) стандартного образца тримебутина количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и растворяли в ~50 мл метанола, встряхивали до полного растворения вещества. Далее доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Концентрация тримебутина в растворе составила 200,00 мкг/мл.

Приготовление рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина. 0,168 мл исходного раствора внутреннего стандарта тримебутина помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Концентрация тримебутина в растворе составила 168,00 нг/мл.

Исходные, промежуточные и рабочие стандартные растворы анализируемых веществ хранили при температуре от $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение не более 20 дней.

2.2.2 Пробоподготовка биологических образцов

Приготовление модельного образца интактной плазмы крови/ интактной цельной крови. К 200 мкл образца интактной плазмы крови/ интактной цельной крови, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление калибровочных образцов и образцов контроля качества. Калибровочные образцы и образцы контроля качества готовили путем добавления 10 мкл соответствующего смешанного рабочего стандартного раствора лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к 190 мкл интактной плазмы крови/ интактной цельной крови, помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, с последующим интенсивным перемешиванием на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд. Далее к полученному образцу прибавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Полученный супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление образцов контроля качества для оценки различных видов стабильности. Образцы контроля качества готовили путем добавления 10 мкл соответствующего смешанного рабочего стандартного раствора лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к 190 мкл интактной плазмы крови/ интактной цельной крови, помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф»

вместимостью 2 мл, с последующим интенсивным перемешиванием на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд. Далее образцы подвергались соответствующим испытаниям стабильности. После при необходимости производилась разморозка образца, и затем к полученному образцу прибавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Полученный супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление модельных образцов без влияния биологической матрицы. К 190 мкл воды Milli-Q, помещённым в центрифужные микропробирки типа «эпэндорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл соответствующего смешанного рабочего стандартного раствора лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина и 10 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина, полученный раствор перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд. Далее к полученному образцу прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Полученный супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление модельных образцов без учета влияния степени извлечения из биологической матрицы. К 380 мкл образца интактной плазмы крови/ интактной цельной крови, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эпэндорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 800 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Далее 590 мкл супернатанта переносили в хроматографические виалы, прибавляли 10 мкл соответствующего смешанного рабочего стандартного раствора лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина, 10 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего

стандарта тримебутина, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление модельных образцов с разбавлением интактной матрицей в соотношении 1:1. К 200 мкл образца контроля качества, помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 200 мкл интактной плазмы крови и перемешивали на встряхивателе типа «вортекс». Затем отбирали 200 мкл смешанного образца, прибавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление исследуемых образцов плазмы крови здоровых добровольцев. К 200 мкл образца исследуемого образца, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Приготовление исследуемых образцов плазмы крови здоровых добровольцев с разбавлением интактной матрицей в соотношении 1:1. К 200 мкл образца исследуемого образца, помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 200 мкл интактной плазмы крови и перемешивали на встряхивателе типа «вортекс». Затем отбирали 200 мкл смешанного образца, прибавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта тримебутина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Пробоподготовленные образцы хранили в автосамплере хроматографа при температуре 4 °С не более 24 часов.

2.2.3 Условия хроматографического разделения и детектирования

Для хроматографического разделения анализируемых веществ была выбрана хроматографическая колонка YMC-Pack Pro C18, 100x2,0 мм, 3 мкм. В качестве подвижной фазы использовали 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму) – элюент А, 0,1 % муравьиной кислоты в метаноле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму) – элюент В. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования (таблица 6) при скорости потока подвижной фазы 0,70 мл/мин.

Таблица 6 – Градиентное элюирование

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %
0,00	77,00	23,00
1,25	77,00	23,00
4,00	0,00	100,00
5,00	0,00	100,00
5,50	77,00	23,00
7,00	77,00	23,00

Объем вводимой пробы составил 6 мкл. Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–7,00 минут.

Для масс-спектрометрического детектирования анализируемых веществ были выбраны следующие условия:

- ✓ положительный режим ионизации молекул с использованием электроспрея в качестве источника ионизации;
- ✓ напряжение на капилляре электроспрея – +4,25 кВ;
- ✓ распыляющий газ в камере ионизации – 3 л/мин;
- ✓ осушающий газ в камере ионизации – 20 л/мин;
- ✓ температура блока нагрева в камере ионизации – 400 °С;

- ✓ температура линии десольватации – 200 °С;
- ✓ условия детектирования лаптаконитина: 585,30 → 324,15 m/z, 585,30 → 162,15 m/z;
- ✓ условия детектирования N-дезацетиллаптаконитина: 544,25 → 120,00 m/z, 544,25 → 325,25 m/z, 543,25 → 324,10 m/z, 543,25 → 120,10 m/z;
- ✓ условия детектирования тримебутина: 388,20 → 198,05 m/z, 388,20 → 195,10 m/z, 388,20 → 131,05 m/z.

2.2.4 Приготовление элюентов

Приготовление элюента А подвижной фазы: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму). В мерную колбу вместимостью 1000,0 мл помещали ~500 мл воды Milli-Q, прибавляли 1000 мкл муравьиной кислоты и перемешивали, затем прибавляли 800 мкл аммиака водного и перемешивали. Далее доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Хранение элюента А подвижной фазы осуществляли при комнатной температуре в течение не более 14 дней.

Приготовление элюента В подвижные фазы: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму). В мерную колбу вместимостью 1000,0 мл помещали ~500 мл метанола, прибавляли 1000 мкл муравьиной кислоты и перемешивали, затем прибавляли 800 мкл аммиака водного и перемешивали. Далее доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Хранение элюента В подвижной фазы осуществляли при комнатной температуре в течение не более 30 дней.

2.2.5 Фармакокинетический анализ полученных результатов

Фармакокинетические профили изменения значений концентраций лаптаконитина и его метаболита N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после приема препарата Аллафорте[®],

таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР»), характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{\max}) и временем ее достижения (T_{\max}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}), рассчитанной линейно-логарифмическим методом трапеций, площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$). Дополнительно определяли следующие фармакокинетические параметры: период полувыведения ($T_{1/2}$), константа скорости элиминации (K_{el}), оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанного по методу наименьших квадратов, натуральной логарифмической концентрации по отношению ко времени получения последних значений концентрации (не менее трех) свыше нижнего предела количественного определения.

Распределение фармакокинетических параметров описано мерами центральной тенденции (среднее арифметическое, среднее геометрическое, медиана) и мерой разброса данных (стандартное отклонение).

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2

Анализ биологических образцов, содержащих лаппаконитин, N-дезацетиллаппаконитин и тримебутин проводился с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Nexera XR в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь) (Shimadzu Corporation, Япония). В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографическая колонка YMC-Pack Pro C18, 100x2,0 мм, 3 мкм (YMC CO., LTD., Япония). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму) – элюент А, 0,1 % муравьиной кислоты в метаноле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму) – элюент В. Хроматографическое разделение проводили в

градиентном режиме элюирования при скорости потока подвижной фазы 0,70 мл/мин.

Обработка полученных результатов проводилась с использованием программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония, Microsoft Excel, США и R Project 3.5.1 (расширение «bea», версия 2.8.3-2), разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Разработка методики

3.1.1 Подбор внутреннего стандарта

Подбор внутреннего стандарта осуществляли на основании физико-химических свойств анализируемых веществ. Поскольку лапаконитин и N-дезацетиллапаконитин проявляют липофильные свойства ($\log P$ лапаконитина – 1,6 [101], $\log P$ N-дезацетиллапаконитина – 1,7 [102]), то необходимо было выбрать вещество, которое могло бы оптимально удерживаться на хроматографической колонке совместно с анализируемыми веществами. В связи с этим было принято решение в качестве внутреннего стандарта выбрать тримебутин ($\log P$ 4,0 [103]), который также в своей структуре имеет третичный атом азота по аналогии с лапаконитином и N-дезацетиллапаконитином, что позволило в дальнейшем проводить детектирование с использованием одинакового режима ионизации для всех анализируемых веществ. Структурная формула тримебутина приведена на рисунке 3.

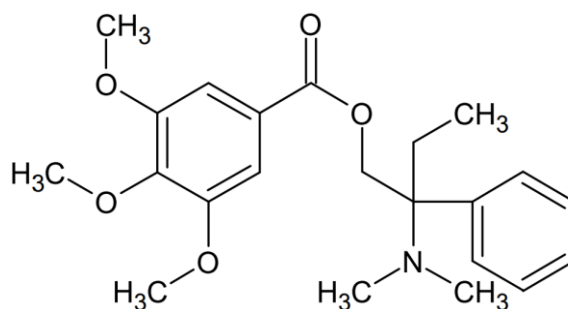


Рисунок 3 – Структурная формула тримебутина

3.1.2 Разработка условий масс-спектрометрического детектирования

Разработку методики определения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина начинали с подбора условий масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). В

качестве источников ионов был выбран электроспрей. Подбор условий детектирования проводился с помощью инъекций метанольных растворов исследуемых веществ и включал в себя три этапа.

1. Выбор параметров источника ионизации. Для оптимального поступления ионизированных молекул в оптическую систему масс-спектрометрического детектора согласно рекомендациям производителя оборудования были выбраны следующие условия: скорость потока распыляющего газа – 3 л/мин; скорость потока осушающего газа – 20 л/мин; температура блока нагрева – 400 °С; температура линии десольватации – 200 °С.

2. Сканирование поступающих в масс-спектрометрический детектор ионов на первом квадруполье с целью определения прекурсор-ионов. Определение прекурсор-ионов проводили в режиме сканирования поступающих ионов на первый квадруполь масс-спектрометрического детектора. Был использован положительный режим ионизации в связи с наличием третичного атома азота в структуре исследуемых веществ. В результате были получены масс-спектры, представленные на рисунках 4–6.

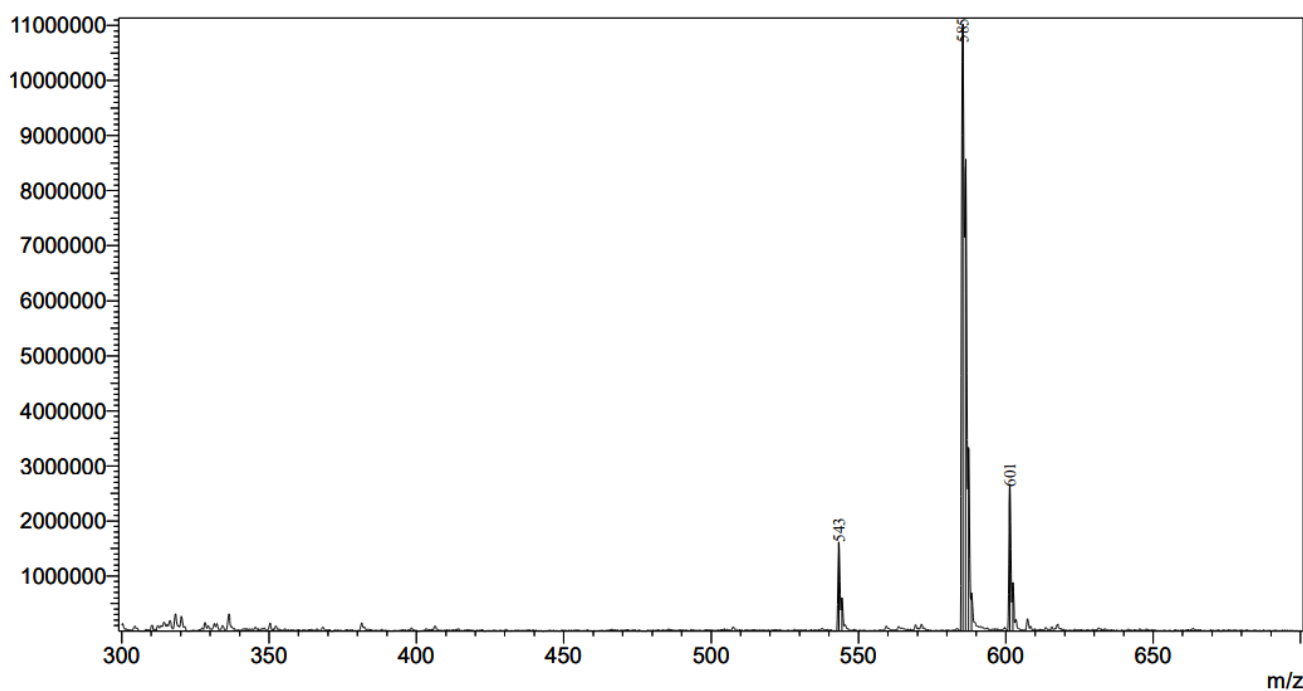


Рисунок 4 – Масс-спектр метанольного раствора лапаконитина (первый квадруполь)

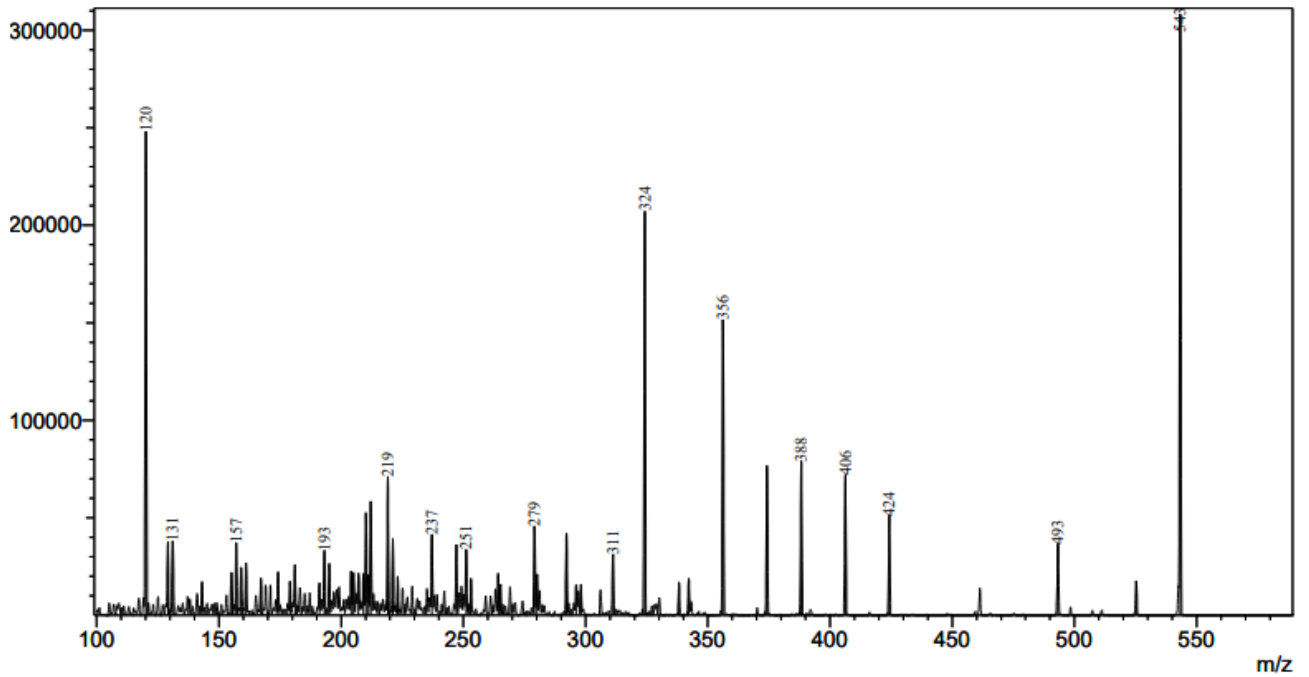


Рисунок 5 – Масс-спектр метанольного раствора N-дезацетиллапаконитина (первый квадруполь)

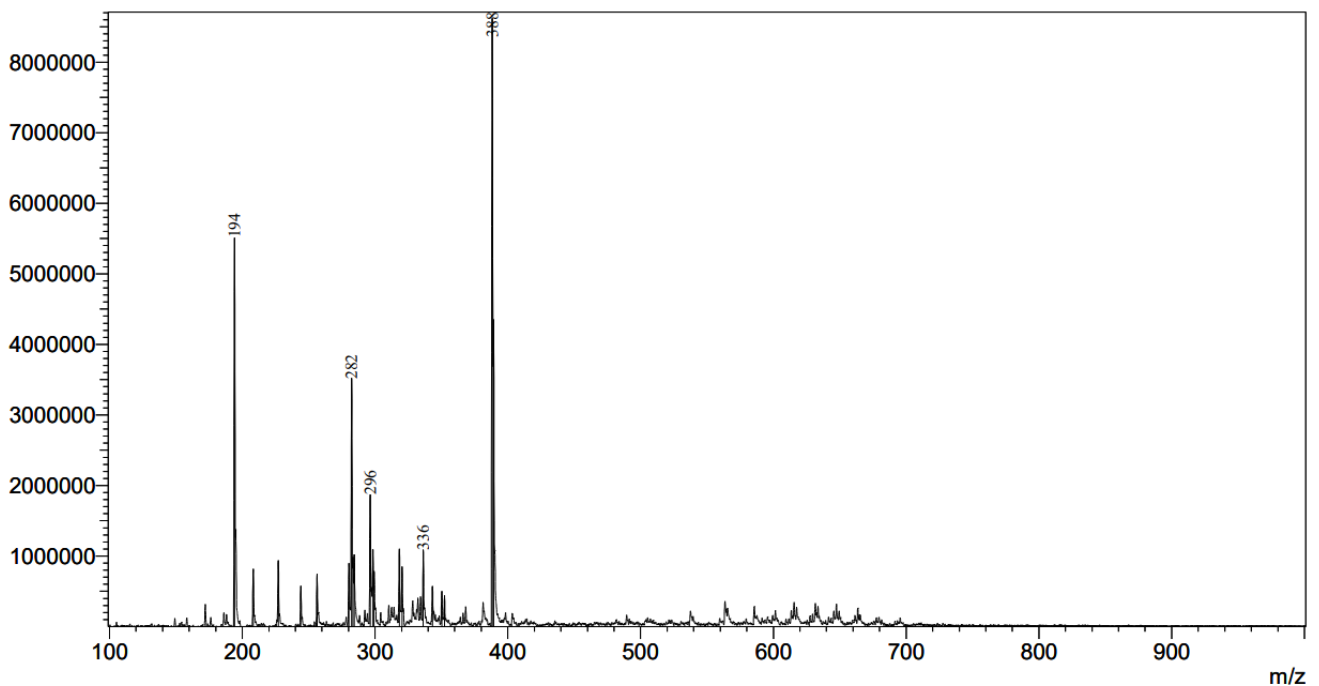


Рисунок 6 – Масс-спектр метанольного раствора тримебутина (первый квадруполь)

Выбор прекурсор-ионов проводили на основании значений относительных молекулярных масс анализируемых веществ: 584,7 – лапаконитин [101]; 542,7 – N-дезацетиллапаконитин [102]; 387,5 – тримебутин). Исходя из предположения о том, что в результате ионизации анализируемых веществ будет образовываться

однозарядный протонированный ион, для иона-прекурсора лаппаконитина было выбрано значение 585 m/z (рисунок 4), для иона-прекурсора N-дезацетиллаппаконитина – 543 m/z (рисунок 5), для иона-прекурсора тримебутина – 388 m/z (рисунок 6).

3. Сканирование ионов на третьем квадруполе, образующихся в результате соударения прекурсор-ионов с молекулами аргона в ячейке соударения (или в так называемом втором квадруполе), с целью определения дочерних ионов. Определение дочерних ионов проводили в режиме сканирования поступающих ионов на третий квадруполь масс-спектрометрического детектора. При этом в программе метода программного обеспечения хроматографической системы были установлены ранее выбранные значения прекурсор-ионов для каждого из анализируемых веществ. В результате были получены масс-спектры, представленные на рисунках 7–9.

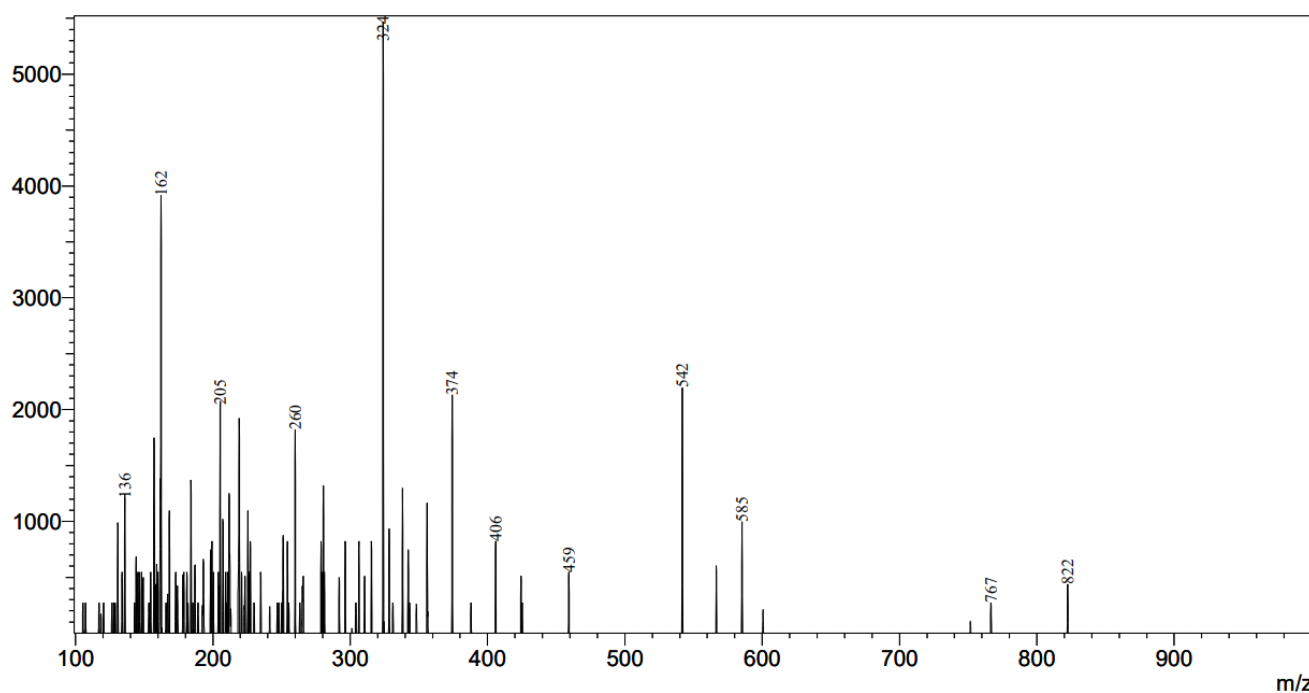


Рисунок 7 – Масс-спектр метанольного раствора лаппаконитина (третий квадруполь)

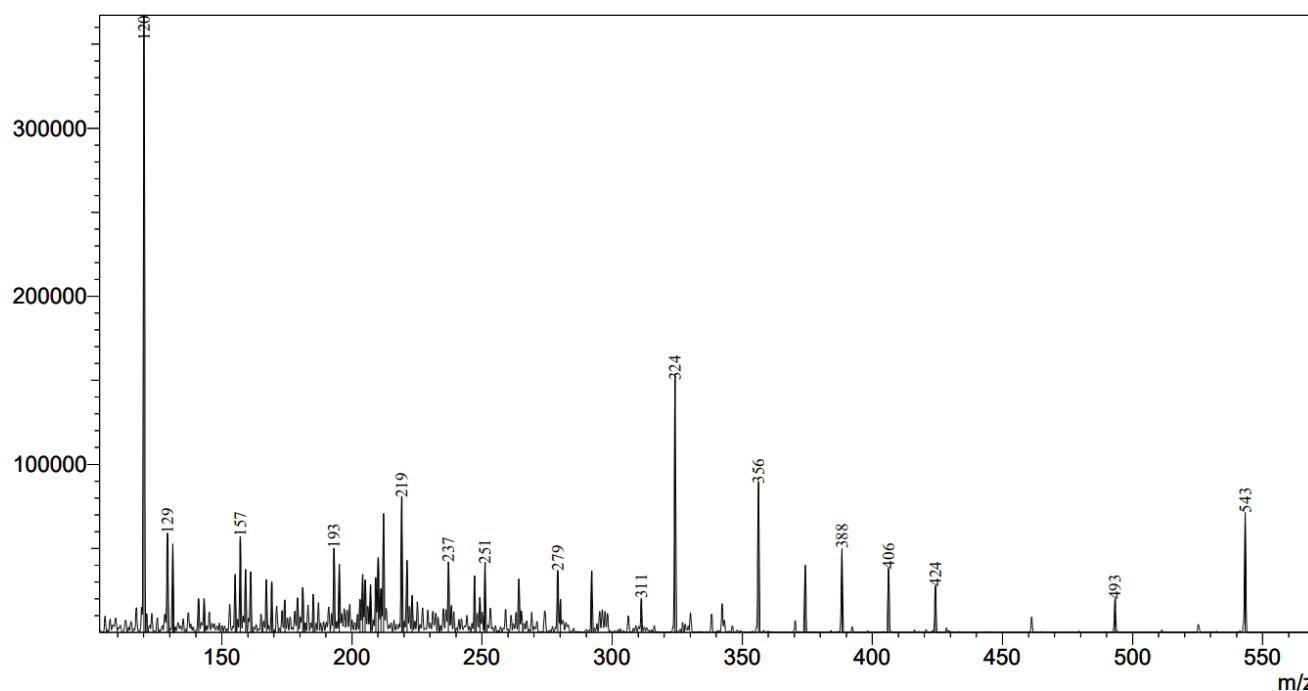


Рисунок 8 – Масс-спектр метанольного раствора N-дезацетиллапаконитина (третий квадруполь)

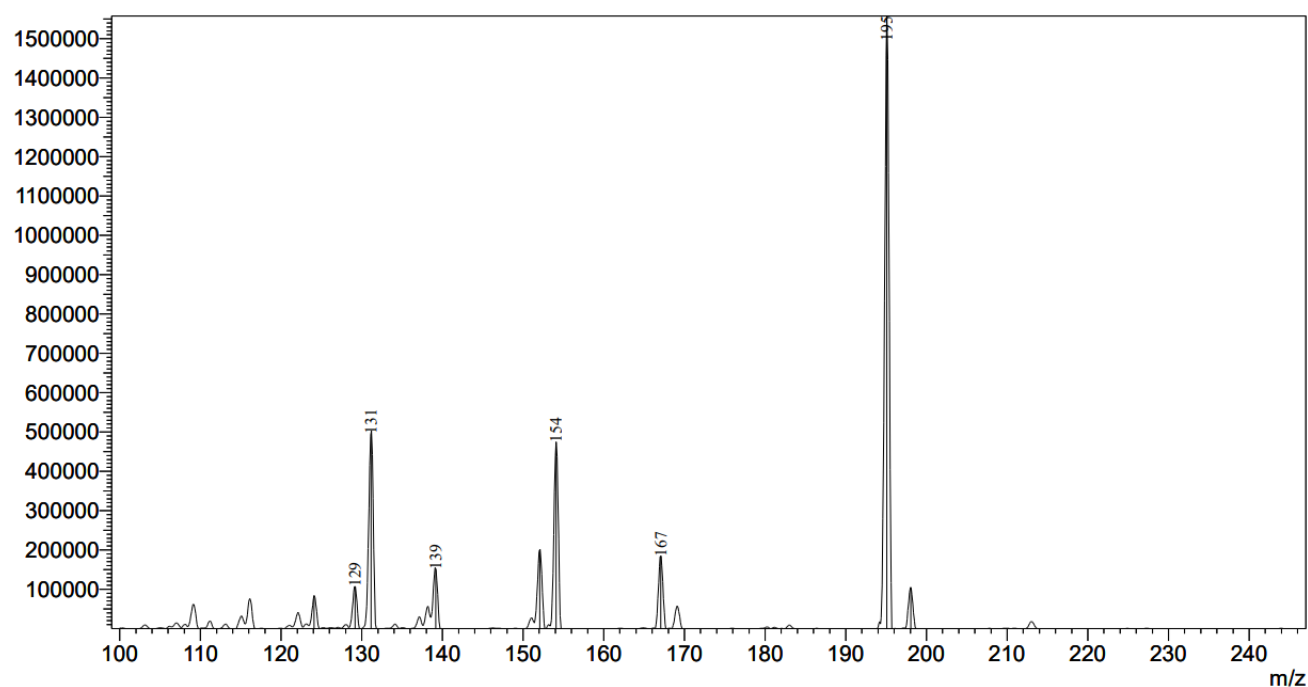


Рисунок 9 – Масс-спектр метанольного раствора тримебутина (третий квадруполь)

Выбор дочерних ионов проводили на основании воспроизводимости полученных сигналов при различных значениях энергии соударения в ячейке соударения. Для лапаконитина были выбраны значения дочерних ионов 324 m/z

и 162 m/z (рисунок 7), для N-дезацетиллаппаконитина – 120 m/z и 324 m/z (рисунок 8), для тримебутина – 195 m/z и 131 m/z.

4. Подбор условий для увеличения интенсивности сигналов и формирование итоговых MRM-переходов. 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 также 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.

Также 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.

3.1.3 Разработка условий хроматографического разделения

После разработки условий масс-спектрометрического детектирования проводили разработку условий хроматографического разделения. Была 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 [104], 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, что обеспечило создание оптимального давления в хроматографической системе.

В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения, поскольку является наиболее быстрым, простым и экономичным в сравнении с жидкость-жидкостной и твердофазной экстракцией. Данный способ пробоподготовки активно используется в общемировой практике для проведения биоаналитических исследований [106–109]. 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.

Пример полученной хроматограммы образца плазмы крови человека, содержащего лапаконитин, N-дезацетиллапаконитин и тримебутин, приведена на рисунке 10.

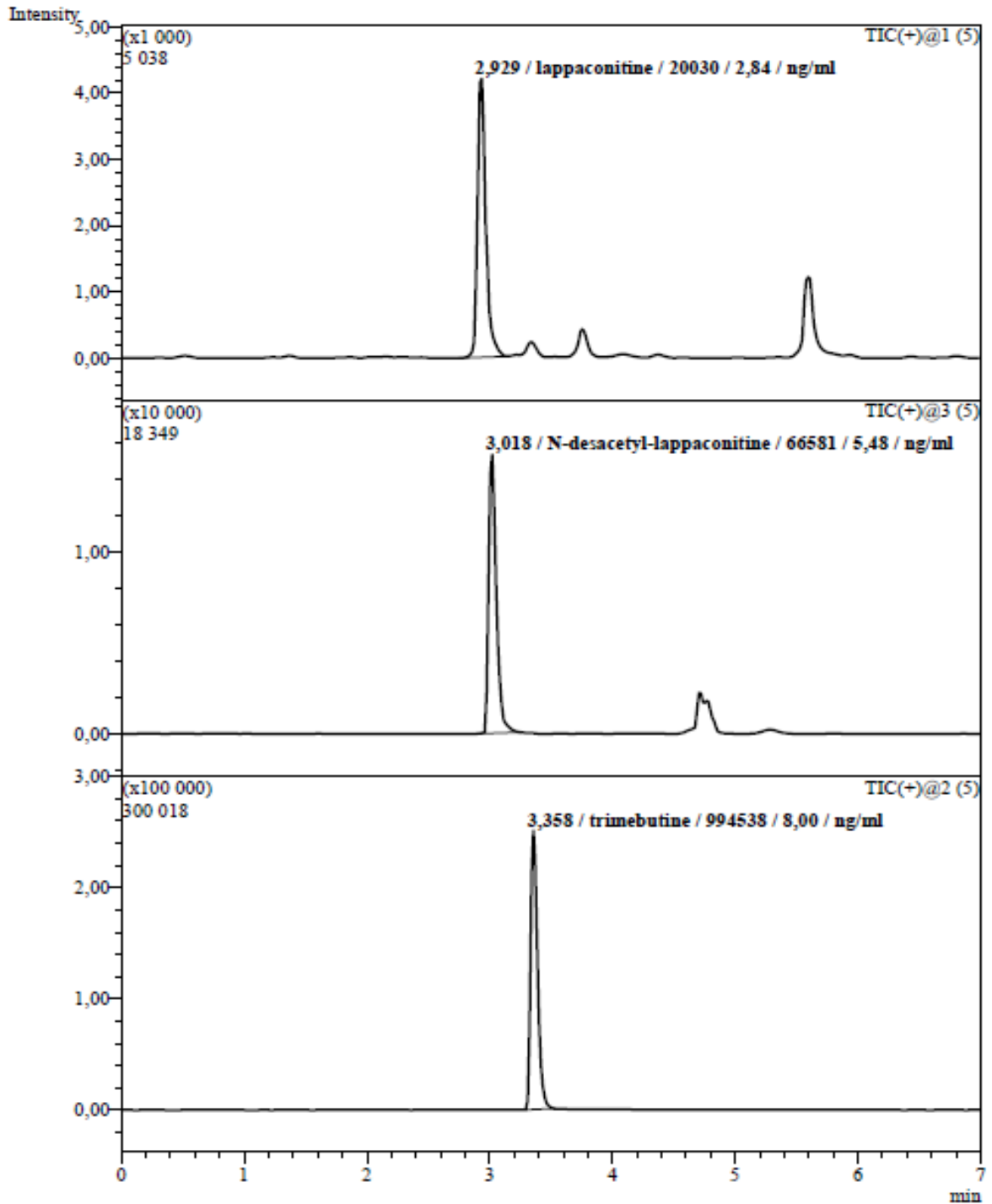


Рисунок 10 – Хроматограмма образца плазмы крови человека, содержащего лапаконитин, N-дезацетиллапаконитин и тримебутин (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лапаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллапаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

3.1.4 Выбор аналитических диапазонов методики

Поскольку в литературных источниках отсутствуют данные об оценке фармакокинетических параметров лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина, то было принято решение использовать «оценочный» подход для подбора аналитических диапазонов анализируемых веществ [110, 111]. Данный подход включал в себя следующую последовательность действий:

- 1) приготовление серии рабочих стандартных растворов № 1 (таблица 4) для приготовления серии модельных образцов № 1 (таблица 7);
- 2) построение калибровочного графика после анализа серии модельных образцов № 1;
- 3) анализ образцов плазмы крови от двух добровольцев, участвовавших в исследовании фармакокинетики препаратов лапаконитина гидробромида;
- 4) расчёт концентраций образцов плазмы крови добровольцев по построенному калибровочному графику;
- 5) корректировка аналитических диапазонов для лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина [приготовлена серия растворов № 2 (таблица 5) для получения концентраций в модельных образцах, приведенных в таблице 7 (серия модельных образцов № 2)] на основании полученных концентраций.

Таблица 7 – Концентрации анализируемых веществ в модельных образцах

Наименование модельного образца	Концентрация, нг/мл					
	Серия модельных образцов № 1			Серия модельных образцов № 2		
	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ
КО № 1	1,00	1,00	8,00	0,50	0,50	8,00
КО № 2	10,00	10,00	8,00	1,00	1,00	8,00
КО № 3	50,00	50,00	8,00	3,00	5,00	8,00
КО № 4	100,00	100,00	8,00	9,00	10,00	8,00
КО № 5	300,00	300,00	8,00	15,00	25,00	8,00
КО № 6	500,00	500,00	8,00	25,00	50,00	8,00

Продолжение Таблицы 7

Наименование модельного образца	Концентрация, нг/мл					
	Серия модельных образцов № 1			Серия модельных образцов № 2		
	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ
КО № 7	750,00	750,00	8,00	35,00	75,00	8,00
КО № 8	1000,00	1000,00	8,00	50,00	100,00	8,00
Образец КК, уровень LLOQ	–	–	–	0,50	0,50	8,00
Образец КК, уровень L	–	–	–	1,50	1,50	8,00
Образец КК, уровень М	–	–	–	15,00	30,00	8,00
Образец КК, уровень Н	–	–	–	40,00	80,00	8,00

3.2 Валидация методики

Валидация методики определения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина 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 [105, 112–114].

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 [115–117].

Для выбора оптимальной биологической матрицы в качестве объекта исследования был проведен 1 этап валидации методики определения лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека по следующим параметрам:

- 1) селективность,
- 2) градуировочная кривая (валидационный цикл № 1),
- 3) точность (внутри валидационного цикла № 1),
- 4) прецизионность (внутри валидационного цикла № 1),
- 5) степень извлечения,
- 6) перенос пробы.

Главными критериями выбора биологической матрицы являлось сравнение валидационных параметров, на результаты которых влияла непосредственно биологическая матрица (селективность, эффект матрицы, степень извлечения), а также сравнение удобства работы с биологической матрицей при проведении анализа.

После выбора более подходящей для дальнейшего анализа биологической матрицы был проведен 2 этап валидации методики по следующим параметрам:

- 1) калибровочная кривая (валидационный цикл № 2, валидационный цикл № 3),
- 2) точность и прецизионность (между валидационными циклами № 1 и № 2, между валидационными циклами № 1, № 2, № 3),
- 3) стабильность,
- 4) отсутствие влияния разбавления образцов.

3.2.1 Валидация методики, плазма крови человека, этап 1

3.2.1.1 Градуировочная кривая

В рамках валидационного цикла № 1 проводили анализ образцов, соответствующих калибровочным уровням 1–8, указанным в таблице 7 (серия модельных образцов № 2). По полученным значениям 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 рисунке 12 и на рисунке 13 совместно с уравнениями калибровочных кривых и коэффициентами корреляции.

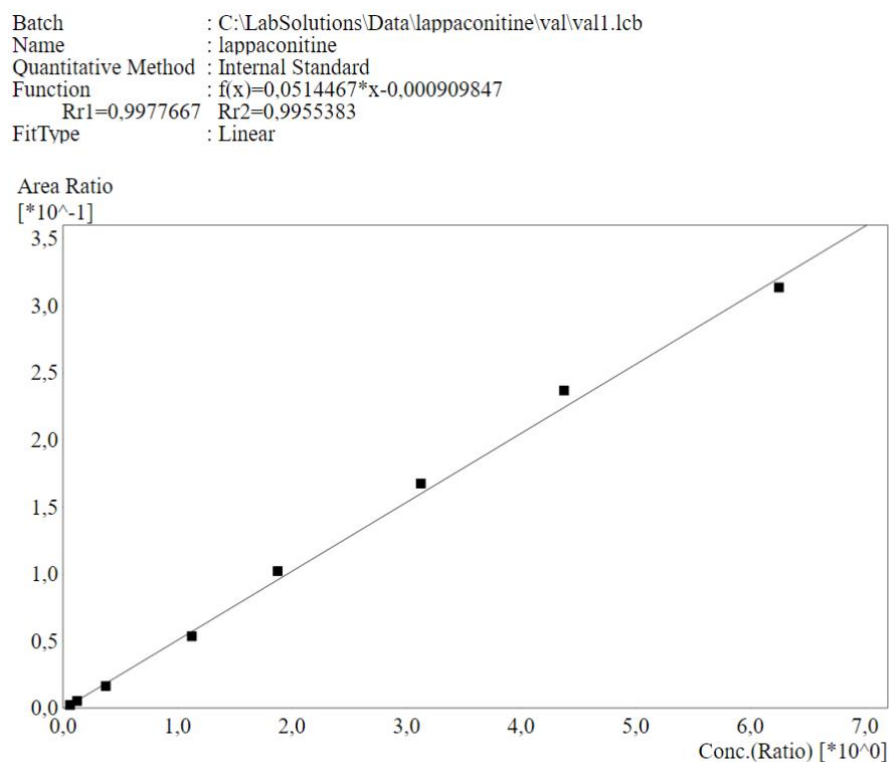


Рисунок 11 – Калибровочный график в координатах отношение площади пика лапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации

лаппаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови, валидационный цикл № 1

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

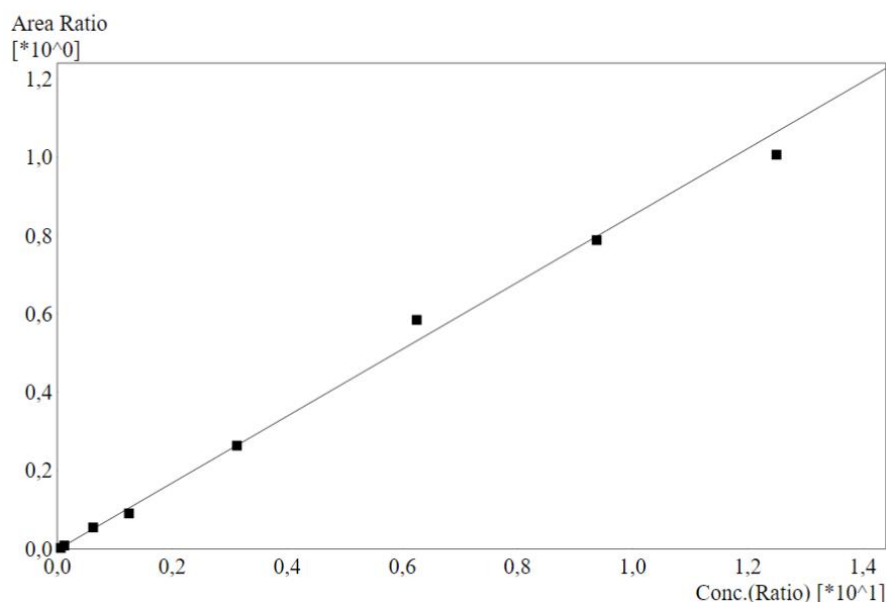


Рисунок 12 – Калибровочный график в координатах отношение площади пика N-дезацетиллаппаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации N-дезацетиллаппаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови, валидационный цикл № 1

Параметры калибровочных кривых приведены в таблице 8 для лаппаконитина и в таблице 9 для N-дезацетиллаппаконитина.

Таблица 8 – Параметры калибровочной кривой для лаппаконитина

№ валидационного цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
1	0,0514467	-0,0000909847	0,9977667

Таблица 9 – Параметры калибровочной кривой для N-дезацетиллаппаконитина

№ валидационного цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
1	0,0853660	-0,00245705	0,9934097

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений соответствовали критериям приемлемости, указанным в нормативной документации [105, 112–114]

(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). Полученные результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Расчет относительной погрешности, валидационный цикл № 1

Уровень №	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, нг/мл		Относительная погрешность, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
1	0,50	0,50	0,51	0,49	2,00	-2,00
2	1,00	1,00	0,98	1,04	-2,00	4,00
3	3,00	5,00	2,71	5,40	-9,67	8,00
4	9,00	10,00	8,48	8,71	-5,78	-12,90
5	15,00	25,00	16,04	24,96	6,93	-0,16
6	25,00	50,00	26,17	55,04	4,68	10,08
7	35,00	75,00	36,96	74,13	5,60	-1,16
8	50,00	100,00	48,91	94,56	-2,18	-5,44

Хроматограммы калибровочных образцов № 1 и № 8 приведены на рисунках 14 и 15, соответственно.

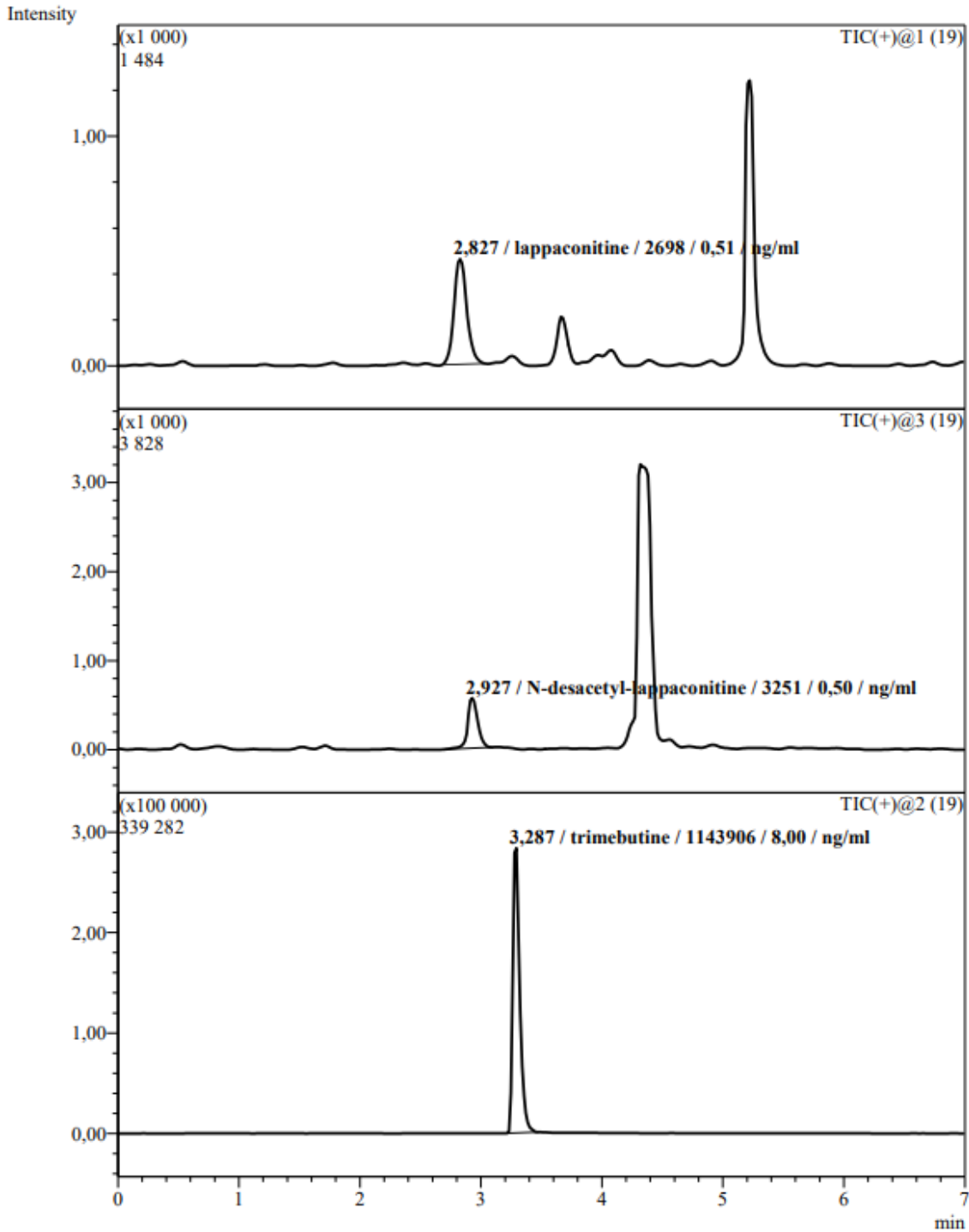


Рисунок 13 – Хроматограмма калибровочного образца № 1, плазма крови человека, валидационный цикл № 1 (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

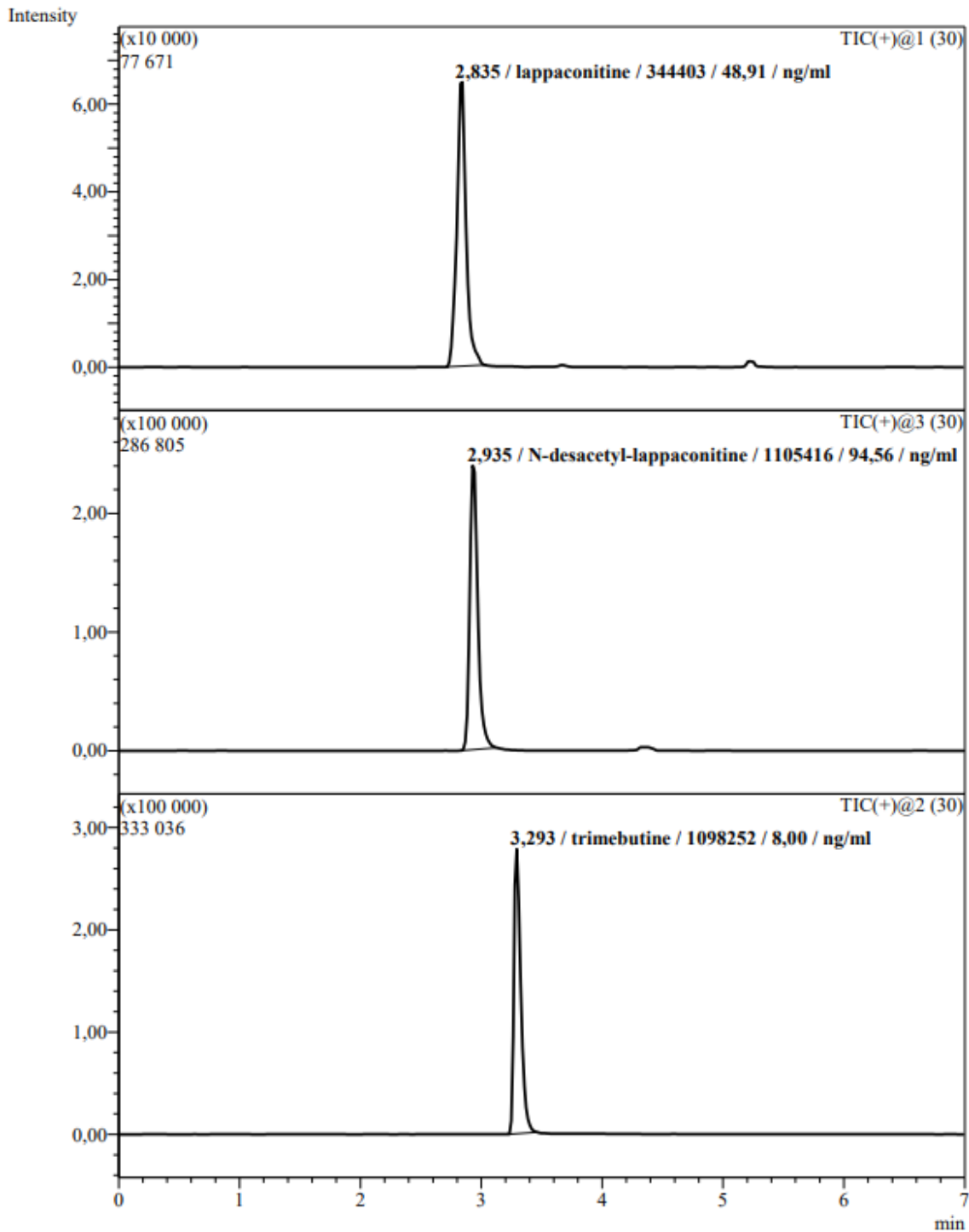


Рисунок 14 – Хроматограмма калибровочного образца № 8, плазма крови человека, валидационный цикл № 1 (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

3.2.1.2 Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, 2 образцов гиперлипидемической интактной плазмы крови, 2 образцов гемолизной интактной плазмы крови, а также образцов контроля качества с содержанием анализируемых веществ и ВС на уровне LLOQ (серия модельных образцов № 2, таблица 7), приготовленных с использованием интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы крови и гиперлипидемической интактной плазмы крови, и «нулевого» образца. Соответствующие расчеты приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Оценка селективности методики определения лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и тримебутина

Наименование образца	Значение площади			Отношение площадей пиков на хроматограммах образцов ИПК (ГЛИПК, ГИПК) к площадям пиков на хроматограммах образцов КК (уровень LLOQ), %		
	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ
Образец КК, уровень LLOQ – ИПК	3164	3120	1138935	-	-	-
Образец КК, уровень LLOQ – ГИПК	2698	3251	1143906	-	-	-
Образец КК, уровень LLOQ – ГЛИПК	2965	2759	1079707	-	-	-
Образец ИПК № 1	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИПК № 2	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИПК № 3	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИПК № 4	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИПК № 5	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИПК № 6	0	0	0	0,00	0,00	0,00

Продолжение Таблицы 11

Наименование образца	Значение площади			Отношение площадей пиков на хроматограммах образцов ИПК (ГЛИПК, ГИПК) к площадям пиков на хроматограммах образцов КК (уровень LLOQ), %		
	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ
Образец ГЛИПК № 1	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ГЛИПК № 2	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ГИПК № 1	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ГИПК № 1	0	0	0	0,00	0,00	0,00

Сигналы анализируемых веществ и ВС образцов интактной плазмы крови, гиперлипидемической интактной плазмы крови и гемолизной интактной плазмы крови не превышали 20,00 % от сигналов образцов контроля качества с содержанием анализируемых веществ и ВС на уровне LLOQ и 5,00 % от сигнала внутреннего стандарта соответственно. Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114]. Пример хроматограммы образца интактной плазмы крови (образец ИПК № 1 – таблица 11) приведен на рисунке 11.

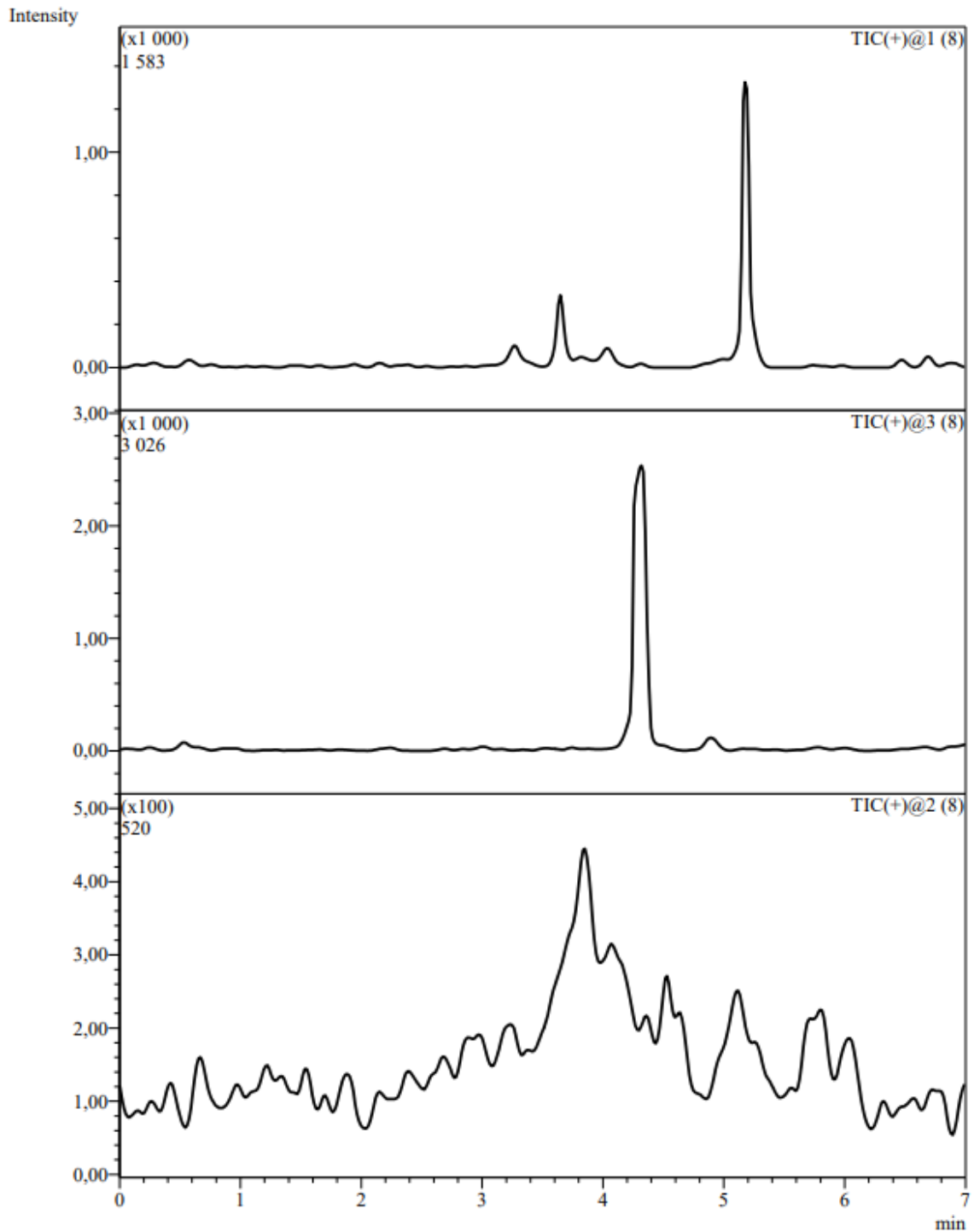


Рисунок 15. Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лапаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллапаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

3.2.1.3 Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих уровням LLOQ, L, M, H (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Анализ проводили по 5 вводов образца для каждого уровня концентраций лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина. Исследование проводили внутри валидационного цикла № 1. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Полученные результаты приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Расчет точности и прецизионности методики внутри валидационного цикла № 1

Уровень	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, среднее значение (n=5), нг/мл		RSD (n=5), %		E, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
LLOQ	0,50	0,50	0,52	0,50	5,14	8,12	4,40	0,00
L	1,50	1,50	1,37	1,45	0,80	3,17	-8,80	-3,07
M	15,00	30,00	13,69	27,19	3,54	2,78	-8,76	-9,37
H	40,00	80,00	37,39	73,61	1,60	2,01	-6,52	-7,99

Полученные 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 согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.1.4 Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали по 6 образцов без влияния степени извлечения из биологической матрицы (образцы, приготовленные с использованием воды) на уровнях L и H, приготовленные с использованием

интактной плазмы крови, гиперлипидемической интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы крови, и по 6 образцов без влияния биологической матрицы на уровнях L и H (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Полученные результаты приведены в таблицах 13–24.

Таблица 13 – Расчёт влияния плазмы крови на количественное определение лапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из плазмы крови			Mf ЛАП	Mf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ЛАП	ТРИ		ЛАП	ТРИ		
L	1	4518	612946	1	5063	754262	1,12	1,23
	2	4439	637511	2	4515	757050	1,02	1,19
	3	3883	623029	3	4773	758689	1,23	1,22
	4	4889	603990	4	4936	757365	1,01	1,25
	5	4661	626699	5	4852	735681	1,04	1,17
	6	3980	600315	6	5206	709433	1,31	1,18
H	1	131005	598638	1	215597	838536	1,65	1,40
	2	132974	580162	2	211192	825584	1,59	1,42
	3	125571	565385	3	207065	791845	1,65	1,40
	4	131540	609278	4	210828	802912	1,60	1,32
	5	129814	569276	5	198315	782974	1,53	1,38
	6	133829	605556	6	204030	781911	1,52	1,29

Таблица 14 – Расчёт влияния плазмы крови на количественное определение N-дезацетиллапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из плазмы крови			Mf ДЕЗ	Mf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ДЕЗ	ТРИ		ДЕЗ	ТРИ		
L	1	8245	612946	1	7915	754262	0,96	1,23
	2	7425	637511	2	7463	757050	1,01	1,19
	3	7382	623029	3	8111	758689	1,10	1,22
	4	7158	603990	4	7990	757365	1,12	1,25
	5	7446	626699	5	7524	735681	1,01	1,17
	6	8074	600315	6	7244	709433	0,90	1,18
H	1	458523	598638	1	685502	838536	1,50	1,40
	2	457690	580162	2	676947	825584	1,48	1,42
	3	438494	565385	3	675075	791845	1,54	1,40
	4	437370	609278	4	660735	802912	1,51	1,32
	5	454393	569276	5	658095	782974	1,45	1,38
	6	453341	605556	6	660192	781911	1,46	1,29

Таблица 15 – Расчёт влияния гиперлипидемической плазмы крови на количественное определение лаптаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из гиперлипидемической плазмы крови			Mf ЛАП	Mf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ЛАП	ТРИ		ЛАП	ТРИ		
L	1	4518	612946	1	5910	689642	1,31	1,13
	2	4439	637511	2	5359	670420	1,21	1,05
	3	3883	623029	3	4717	655144	1,21	1,05
	4	4889	603990	4	4906	643459	1,00	1,07
	5	4661	626699	5	4873	619144	1,05	0,99
	6	3980	600315	6	4933	642143	1,24	1,07
H	1	131005	598638	1	163160	649986	1,25	1,09
	2	132974	580162	2	165943	665285	1,25	1,15
	3	125571	565385	3	161298	638115	1,28	1,13
	4	131540	609278	4	161676	625470	1,23	1,03
	5	129814	569276	5	155567	629057	1,20	1,11
	6	133829	605556	6	153852	631441	1,15	1,04

Таблица 16 – Расчёт влияния гиперлипидемической плазмы крови на количественное определение N-дезацетиллапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из гиперлипидемической плазмы крови			Mf ДЕЗ	Mf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ДЕЗ	ТРИ		ДЕЗ	ТРИ		
L	1	8245	612946	1	9051	689642	1,10	1,13
	2	7425	637511	2	7829	670420	1,05	1,05
	3	7382	623029	3	8262	655144	1,12	1,05
	4	7158	603990	4	6935	643459	0,97	1,07
	5	7446	626699	5	7501	619144	1,01	0,99
	6	8074	600315	6	7067	642143	0,88	1,07
H	1	458523	598638	1	553662	649986	1,21	1,09
	2	457690	580162	2	536476	665285	1,17	1,15
	3	438494	565385	3	539572	638115	1,23	1,13
	4	437370	609278	4	520646	625470	1,19	1,03
	5	454393	569276	5	510063	629057	1,12	1,11
	6	453341	605556	6	496031	631441	1,09	1,04

Таблица 17 – Расчёт влияния гемолизной плазмы крови на количественное определение лапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из гемолизной плазмы крови			Mf ЛАП	Mf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ЛАП	ТРИ		ЛАП	ТРИ		
L	1	4518	612946	1	5728	750376	1,27	1,22
	2	4439	637511	2	4496	755407	1,01	1,18
	3	3883	623029	3	4860	725653	1,25	1,16
	4	4889	603990	4	5426	737716	1,11	1,22
	5	4661	626699	5	4492	709010	0,96	1,13
	6	3980	600315	6	5436	738697	1,37	1,23
H	1	131005	598638	1	166747	713855	1,27	1,19
	2	132974	580162	2	172900	739283	1,30	1,27
	3	125571	565385	3	166200	726217	1,32	1,28
	4	131540	609278	4	165595	732335	1,26	1,20
	5	129814	569276	5	169477	711103	1,31	1,25
	6	133829	605556	6	167272	712883	1,25	1,18

Таблица 18 – Расчёт влияния гемолизной плазмы крови на количественное определение N-дезацетиллапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из гемолизной плазмы крови			Mf ДЕЗ	Mf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ДЕЗ	ТРИ		ДЕЗ	ТРИ		
L	1	8245	612946	1	9327	750376	1,13	1,22
	2	7425	637511	2	8378	755407	1,13	1,18
	3	7382	623029	3	8112	725653	1,10	1,16
	4	7158	603990	4	7483	737716	1,05	1,22
	5	7446	626699	5	8184	709010	1,10	1,13
	6	8074	600315	6	7431	738697	0,92	1,23
H	1	458523	598638	1	557517	713855	1,22	1,19
	2	457690	580162	2	551667	739283	1,21	1,27
	3	438494	565385	3	548218	726217	1,25	1,28
	4	437370	609278	4	547272	732335	1,25	1,20
	5	454393	569276	5	558986	711103	1,23	1,25
	6	453341	605556	6	563794	712883	1,24	1,18

Таблица 19 – Расчёт фактора матрицы лапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием интактной плазмы крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ЛАП	Mf ТРИ	Mf ЛАП	Mf ТРИ		
1	1,12	1,23	1,65	1,40	0,91	1,17
2	1,02	1,19	1,59	1,42	0,86	1,12
3	1,23	1,22	1,65	1,40	1,01	1,18
4	1,01	1,25	1,60	1,32	0,81	1,22
5	1,04	1,17	1,53	1,38	0,89	1,11
6	1,31	1,18	1,52	1,29	1,11	1,18
Среднее					0,93	1,16
CV, %					11,87	3,53

Таблица 20 – Расчёт фактора матрицы лапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием гиперлипидемической интактной плазмы крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ЛАП	Mf ТРИ	Mf ЛАП	Mf ТРИ		
1	1,31	1,13	1,25	1,09	1,16	1,15
2	1,21	1,05	1,25	1,15	1,15	1,09
3	1,21	1,05	1,28	1,13	1,16	1,14
4	1,00	1,07	1,23	1,03	0,94	1,20
5	1,05	0,99	1,20	1,11	1,06	1,08
6	1,24	1,07	1,15	1,04	1,16	1,10
Среднее					1,10	1,13
CV, %					8,03	3,84

Таблица 21 – Расчёт фактора матрицы лапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием гемолизной плазмы крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ЛАП	Mf ТРИ	Mf ЛАП	Mf ТРИ		
1	1,27	1,22	1,27	1,19	1,04	1,07
2	1,01	1,18	1,30	1,27	0,85	1,02
3	1,25	1,16	1,32	1,28	1,07	1,03
4	1,11	1,22	1,26	1,20	0,91	1,05
5	0,96	1,13	1,31	1,25	0,85	1,05
6	1,37	1,23	1,25	1,18	1,11	1,06
Среднее					0,97	1,05
CV, %					11,79	1,71

Таблица 22 – Расчёт фактора матрицы N-дезацетиллапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием интактной плазмы крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ДЕЗ	Mf ТРИ	Mf ДЕЗ	Mf ТРИ		
1	0,96	1,23	1,50	1,40	0,78	1,07
2	1,01	1,19	1,48	1,42	0,85	1,04
3	1,10	1,22	1,54	1,40	0,90	1,10
4	1,12	1,25	1,51	1,32	0,89	1,15
5	1,01	1,17	1,45	1,38	0,86	1,05
6	0,90	1,18	1,46	1,29	0,76	1,13
Среднее					0,84	1,09
CV, %					6,94	3,93

Таблица 23 – Расчёт фактора матрицы N-дезацетиллапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием гиперлипидемической интактной плазмы крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ДЕЗ	Mf ТРИ	Mf ДЕЗ	Mf ТРИ		
1	1,10	1,13	1,21	1,09	0,98	1,11
2	1,05	1,05	1,17	1,15	1,00	1,02
3	1,12	1,05	1,23	1,13	1,06	1,09
4	0,97	1,07	1,19	1,03	0,91	1,16
5	1,01	0,99	1,12	1,11	1,02	1,02
6	0,88	1,07	1,09	1,04	0,82	1,05
Среднее					0,97	1,07
CV, %					9,15	5,22

Таблица 24 – Расчёт фактора матрицы N-дезацетиллапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием гемолизной плазмы крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ДЕЗ	Mf ТРИ	Mf ДЕЗ	Mf ТРИ		
1	1,13	1,22	1,22	1,19	0,92	1,02
2	1,13	1,18	1,21	1,27	0,95	0,95
3	1,10	1,16	1,25	1,28	0,94	0,97
4	1,05	1,22	1,25	1,20	0,86	1,04
5	1,10	1,13	1,23	1,25	0,97	0,98
6	0,92	1,23	1,24	1,18	0,75	1,06
Среднее					0,90	1,00
CV, %					9,35	4,24

Фактор матрицы рассчитывался как отношение значения площади пика анализируемого вещества на хроматограмме образца, приготовленного с использованием интактной плазмы крови (интактной гиперлипидемической

плазмы крови, интактной гемолизной плазмы крови) после осаждения белков (учитывает влияние биологической матрицы, но не учитывает степень извлечения), к значению площади пика анализируемого вещества на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали как отношение значения фактора матрицы анализируемого вещества к фактору матрицы внутреннего стандарта. Коэффициент вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, не превышал 15,00 %, что соответствует критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.1.5 Степень извлечения

Для оценки эффекта матрицы анализировали по 3 образца без влияния степени извлечения из биологической матрицы на уровнях L, M и H, приготовленные с использованием интактной плазмы крови, гиперлипидемической интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы крови, и по 3 образца контроля качества на уровнях L, M и H (образцы с учетом влияния степени извлечения из биологической матрицы) (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Полученные результаты приведены в таблицах 25–32.

Таблица 25 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов без учета влияния степени извлечения анализируемых веществ из плазмы крови

Уровень	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ТРИ
L	1	5063	7915	754262	0,007	0,010
	2	4515	7463	757050	0,006	0,010
	3	4773	8111	758689	0,006	0,011
M	1	59488	188024	567097	0,105	0,332
	2	59992	199019	620276	0,097	0,321

Продолжение Таблицы 25

Уровень	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ТРИ
	3	56113	195373	632275	0,089	0,309
Н	1	215597	685502	838536	0,257	0,817
	2	211192	676947	825584	0,256	0,820
	3	207065	675075	791845	0,261	0,853

Таблица 26 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов с учетом влияния степени извлечения анализируемых веществ из плазмы крови

Уровень	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ТРИ
L	1	4971	7846	601948	0,008	0,013
	2	4290	6589	595928	0,007	0,011
	3	4499	7333	580522	0,008	0,013
M	1	47309	168926	590715	0,080	0,286
	2	47255	169198	614648	0,077	0,275
	3	46349	161831	608084	0,076	0,266
H	1	137074	487096	584432	0,235	0,833
	2	138748	478653	593275	0,234	0,807
	3	132433	470094	598521	0,221	0,785

Таблица 27 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов без учета влияния степени извлечения анализируемых веществ из гемолизной плазмы крови

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ТРИ
L	1	5728	9327	750376	0,008	0,012
	2	4496	8378	755407	0,006	0,011
	3	4860	8112	725653	0,007	0,011

Продолжение Таблицы 27

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ТРИ
М	1	55707	181277	601810	0,093	0,301
	2	51900	178260	575162	0,090	0,310
	3	50391	175197	572933	0,088	0,306
Н	1	166747	557517	713855	0,234	0,781
	2	172900	551667	739283	0,234	0,746
	3	166200	548218	726217	0,229	0,755

Таблица 28 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов с учетом влияния степени извлечения анализируемых веществ из гемолизной плазмы крови

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ ТРИ
L	1	5836	7704	586776	0,010	0,013
	2	4993	7358	572964	0,009	0,013
	3	4828	8187	560925	0,009	0,015
М	1	50759	174648	575692	0,088	0,303
	2	52265	173981	570842	0,092	0,305
	3	51620	184535	569456	0,091	0,324
Н	1	161833	530817	573925	0,282	0,925
	2	160965	540160	560113	0,287	0,964
	3	160872	528324	572028	0,281	0,924

Таблица 29 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов без учета влияния степени извлечения анализируемых веществ из гиперлипидемической плазмы крови

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ ТРИ
L	1	5910	9051	689642	0,009	0,013
	2	5359	7829	670420	0,008	0,012
	3	4717	8262	655144	0,007	0,013
M	1	49768	164723	590368	0,084	0,279
	2	48261	159879	589884	0,082	0,271
	3	51010	168730	585051	0,087	0,288
H	1	163160	553662	649986	0,251	0,852
	2	165943	536476	665285	0,249	0,806
	3	161298	539572	638115	0,253	0,013

Таблица 30 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов с учетом влияния степени извлечения анализируемых веществ из гиперлипидемической плазмы крови

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ ТРИ
L	1	4415	7337	575422	0,008	0,013
	2	4734	7154	596423	0,008	0,012
	3	4861	8354	570214	0,009	0,015
M	1	51622	170949	587264	0,088	0,291
	2	50213	172339	602556	0,083	0,286
	3	52308	182853	578008	0,090	0,316
H	1	148400	511356	570692	0,260	0,896
	2	146595	504210	589133	0,249	0,856
	3	145261	7337	585928	0,248	0,013

Таблица 31 – Расчет относительного стандартного отклонения степени извлечения лаппаконитина на уровнях L, M, и H из биологических матриц

Вид биологической матрицы	Степень извлечения, %		
	Уровень L	Уровень M	Уровень H
Плазма крови	123,03	76,35	91,22
	120,71	79,49	91,42
	123,19	85,89	84,62
Гемолизная плазма крови	130,29	95,25	120,72
	146,42	101,47	122,88
	128,52	103,06	122,88
Гиперлипидемическая плазма крови	89,53	104,27	103,59
	99,30	101,86	99,76
	118,40	103,79	98,08
Среднее	119,93	94,60	103,91
RSD, %	14,00	11,74	14,20

Таблица 32 – Расчет относительного стандартного отклонения степени извлечения N-дезацетиллаппаконитина на уровнях L, M, и H из биологических матриц

Вид биологической матрицы	Степень извлечения, %		
	Уровень L	Уровень M	Уровень H
Плазма крови	124,21	86,25	101,95
	112,16	85,79	98,39
	118,16	86,13	92,13
Гемолизная плазма крови	105,63	100,71	118,42
	115,79	98,34	129,24
	130,56	105,97	122,35
Гиперлипидемическая плазма крови	97,15	104,33	105,19
	102,72	105,53	106,13
	116,17	109,69	97,97
Среднее	113,62	98,08	107,97
RSD, %	9,27	9,75	11,61

Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина из биологических матриц не превышало 15,00 %, что соответствует критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.1.6 Перенос пробы

Перенос пробы оценивали путем последовательной инъекции модельного образца № 8 (серия модельных образцов № 2, таблица 7) и интактного образца плазмы крови. На хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина и тримебутина. Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.2 Валидация методики, цельная кровь человека, этап 1

3.2.2.1 Градуировочная кривая

В рамках валидационного цикла № 1 проводили анализ образцов, соответствующих калибровочным уровням 1–8, указанным в таблице 7 (серия модельных образцов № 2). По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика лапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации лапаконитина к концентрации тримебутина в цельной 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 цельной крови. Примеры калибровочных графиков приведены на рисунке 17 и на рисунке 18 совместно с уравнениями калибровочных кривых и коэффициентами корреляции.

Batch : C:\LabSolutions\Data\lappaaconitine\val\val1.lcb
 Name : lappaconitine
 Quantitative Method : Internal Standard
 Function : $f(x)=0,0496107*x-0,000632168$
 Rr1=0,9967686 Rr2=0,9935476
 FitType : Linear

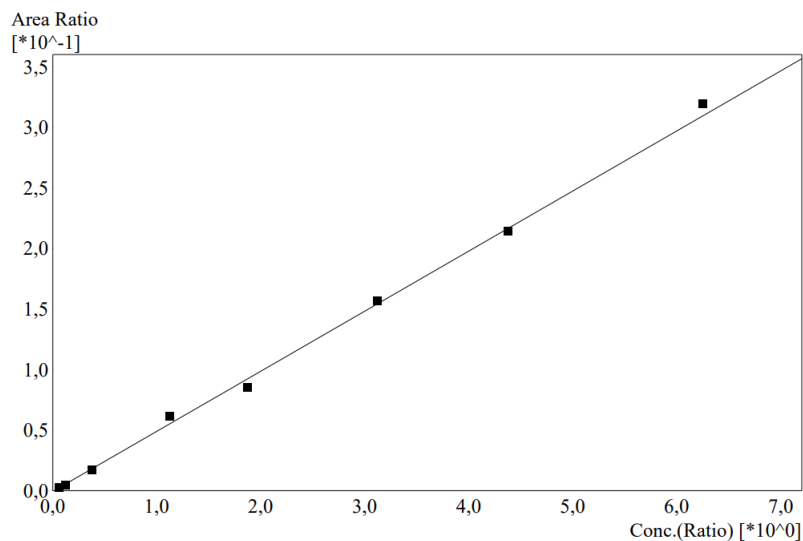


Рисунок 16 – Калибровочный график в координатах отношение площади пика лапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации лапаконитина к концентрации тримебутина в цельной крови

Batch : C:\LabSolutions\Data\lappaaconitine\val\val1.lcb
 Name : N-desacetyl-lappaconitine
 Quantitative Method : Internal Standard
 Function : $f(x)=0,0858191*x-0,000822017$
 Rr1=0,9969946 Rr2=0,9939983
 FitType : Linear

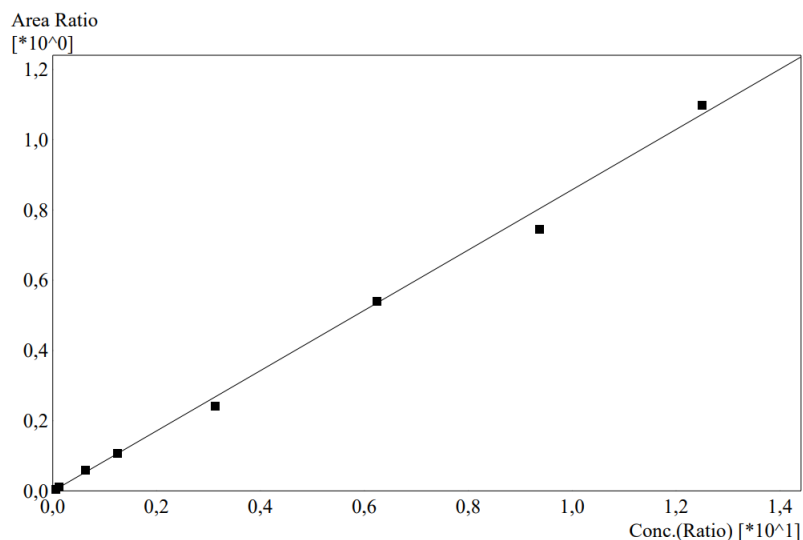


Рисунок 17 – Калибровочный график в координатах отношение площади пика N-дезацетиллапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации N-дезацетиллапаконитина к концентрации тримебутина в цельной крови

Параметры калибровочных кривых приведены в таблице 33 для лапаконитина и в таблице 34 для N-дезацетиллапаконитина.

Таблица 33 – Параметры калибровочной кривой для лапаконитина

№ валидационного цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
1	0,0496107	-0,000632168	0,9967686

Таблица 34 – Параметры калибровочной кривой для N-дезацетиллапаконитина

№ валидационного цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
1	0,0858191	-0,000822017	0,9969946

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). Полученные результаты приведены в таблице 35.

Таблица 35 – Расчет относительной погрешности, валидационный цикл № 1

Уровень №	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, нг/мл		Относительная погрешность, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
1	0,50	0,50	0,53	0,48	6,00	-4,00
2	1,00	1,00	0,90	1,05	-10,00	5,00
3	3,00	5,00	2,90	5,62	-3,33	12,40
4	9,00	10,00	10,08	10,00	12,00	0,00
5	15,00	25,00	13,88	22,55	-7,47	-9,80
6	25,00	50,00	25,42	50,38	1,68	0,76
7	35,00	75,00	34,64	69,58	-1,03	-7,23
8	50,00	100,00	51,64	102,31	3,28	2,31

Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114]. Хроматограммы калибровочных образцов № 1 и № 8 на рисунках 19 и 20, соответственно.

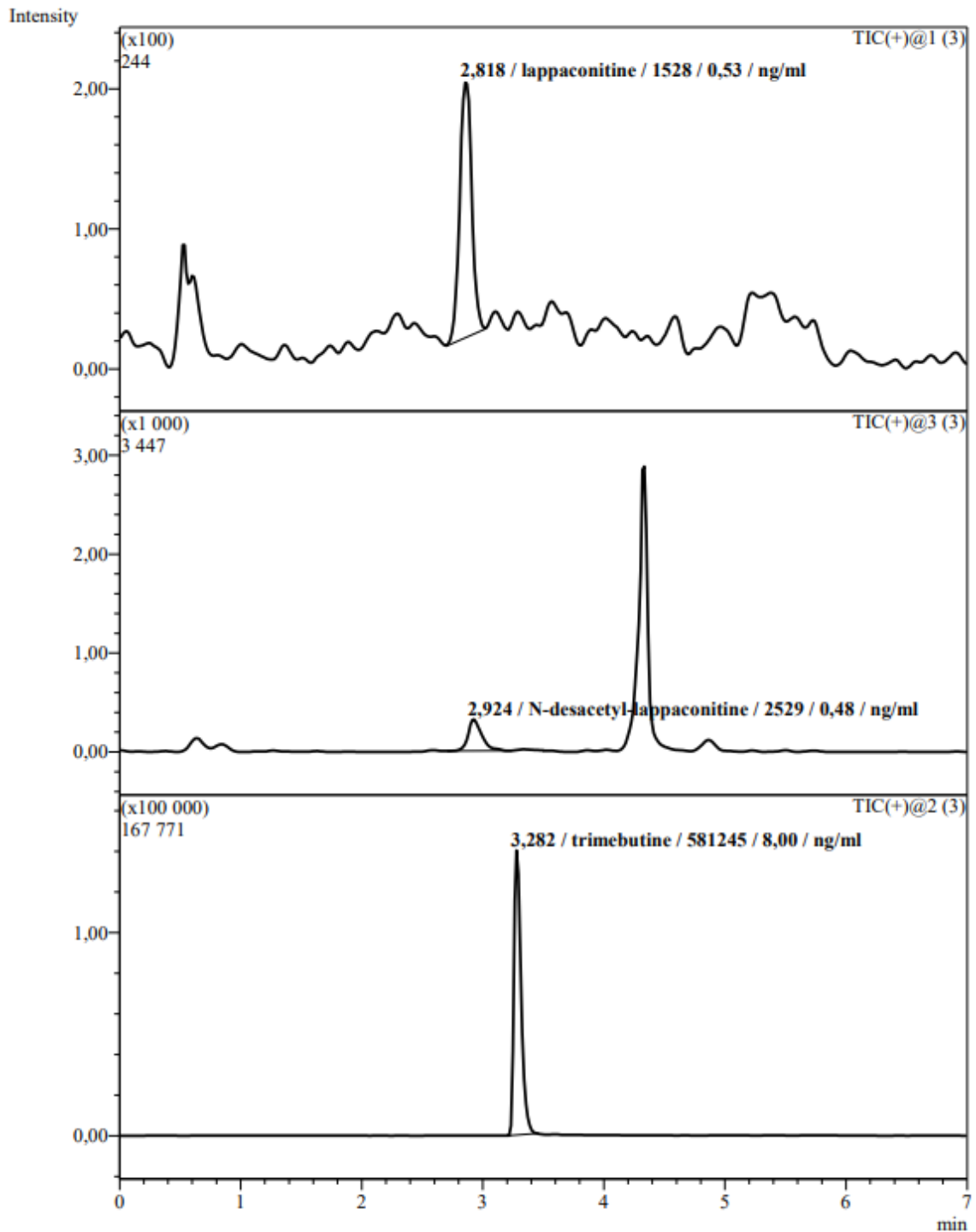


Рисунок 18 – Хроматограмма калибровочного образца № 1, цельная кровь человека, валидационный цикл № 1 (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

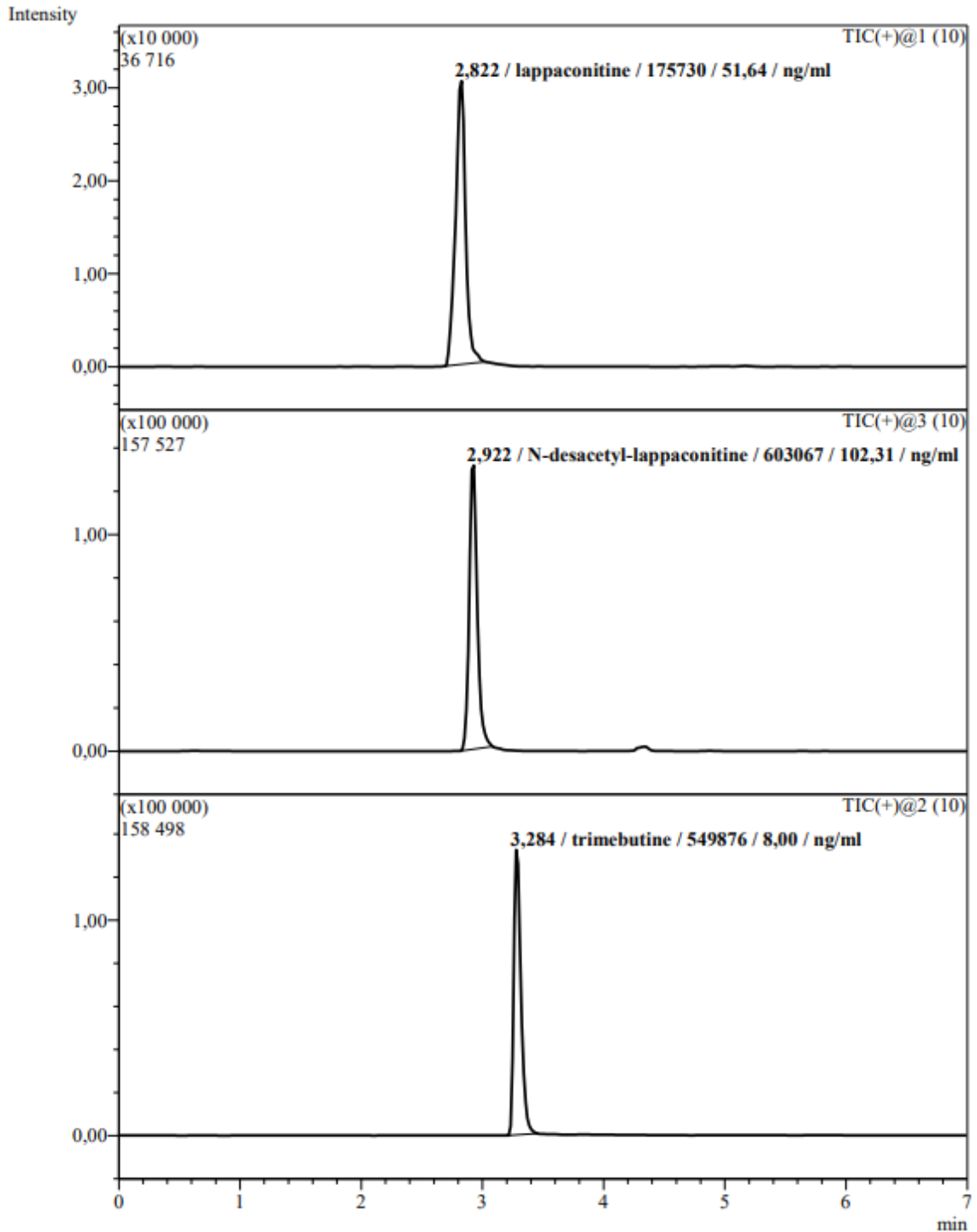


Рисунок 19 – Хроматограмма калибровочного образца № 8, цельная кровь человека, валидационный цикл № 1 (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

3.2.2.2 Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной цельной крови, а также калибровочного образца с содержанием анализируемых веществ и ВС на уровне 1 (серия модельных образцов № 2, таблица 7), приготовленных с использованием интактной цельной крови, и «нулевого» образца. Сигналы анализируемых веществ и ВС образцов цельной крови не превышали 20,00 % от сигналов калибровочного образца № 1 и 5,00 % от сигнала ВС соответственно. На хроматограмме «нулевого» образца отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина. Соответствующие расчеты приведены в таблице 36.

Таблица 36 – Оценка селективности методики определения лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина и тримебутина

Наименование образца	Значение площади			Отношение площадей пиков на хроматограммах образцов ИЦК к площадям пиков на хроматограмме образца КК (уровень LLOQ)		
	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП	ДЕЗ	ТРИ
Калибровочный образец № 1	1528	2529	581245	-	-	-
Образец ИЦК № 1	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИЦК № 2	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИЦК № 3	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИЦК № 4	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИЦК № 5	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Образец ИЦК № 6	0	0	0	0,00	0,00	0,00

Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114]. Пример хроматограммы образца интактной цельной крови (образец ИЦК № 1 – таблица 36) приведен на рисунке 16.

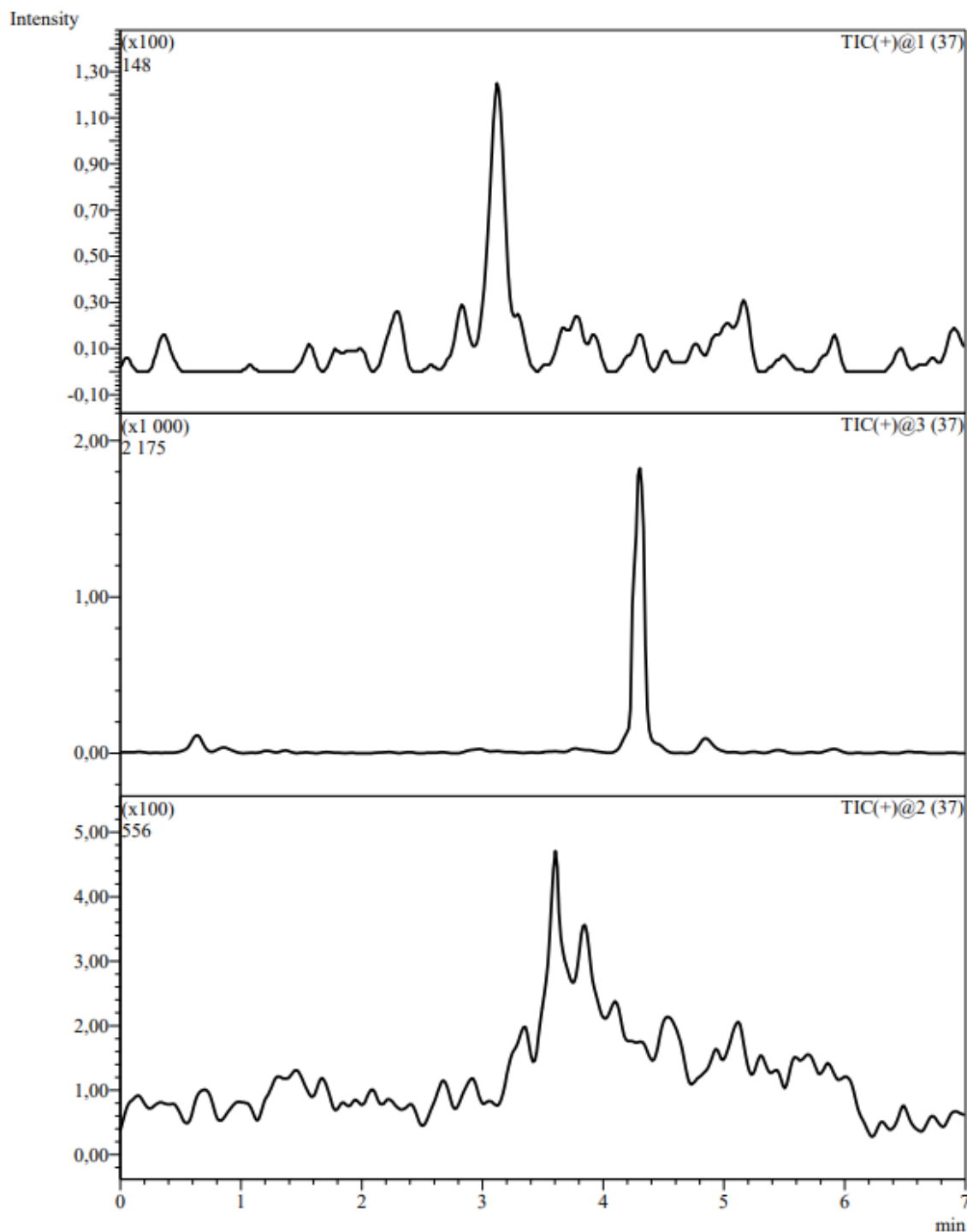


Рисунок 20 – Хроматограмма образца интактной цельной крови человека (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лапаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллапаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

3.2.2.3 Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих уровням LLOQ, L, M, H (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Анализ проводили по 5 вводов образца для каждого уровня концентраций лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина. Исследование проводили внутри валидационного цикла № 1. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Полученные результаты приведены в таблице 37.

Таблица 37 – Расчет точности и прецизионности методики внутри валидационного цикла № 1

Уровень	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, среднее значение (n=5), нг/мл		RSD (n=5), %		E, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
LLOQ	0,50	0,50	0,50	0,45	6,34	-9,60	0,80	-9,60
L	1,50	1,50	1,37	1,48	4,43	-1,60	-8,67	-1,60
M	15,00	30,00	16,19	33,28	5,97	10,94	7,95	10,94
H	40,00	80,00	45,05	83,55	2,04	4,44	12,63	4,44

Полученные 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 согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.2.4 Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали по 6 образцов без влияния степени извлечения из биологической матрицы (образцы, приготовленные с

использованием воды) на уровнях L и H, приготовленные с использованием интактной цельной крови, и по 6 образцов без влияния биологической матрицы на уровнях L и H (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Полученные результаты приведены в таблицах 38–41.

Таблица 38 – Расчёт влияния цельной крови на количественное определение лапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды			Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из цельной крови			Мf ЛАП	Мf ТРИ
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ЛАП	ТРИ		ЛАП	ТРИ		
L	1	4518	612946	1	3831	546324	0,85	0,89
	2	4439	637511	2	4444	551176	1,00	0,86
	3	3883	623029	3	3576	544790	0,92	0,87
	4	4889	603990	4	3752	530777	0,77	0,88
	5	4661	626699	5	3730	546969	0,80	0,87
	6	3980	600315	6	4032	528091	1,01	0,88
H	1	131005	598638	1	133561	510452	1,02	0,85
	2	132974	580162	2	131758	499027	0,99	0,86
	3	125571	565385	3	131330	535313	1,05	0,95
	4	131540	609278	4	131953	527427	1,00	0,87
	5	129814	569276	5	129509	512599	1,00	0,90
	6	133829	605556	6	135678	516082	1,01	0,85

Таблица 39 – Расчёт влияния цельной крови на количественное определение N-дезацетиллапаконитина

Уровень	Образцы, приготовленные с использованием воды		Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения из цельной крови			Mf ДЕЗ	Mf ТРИ	
	№ образца	Площадь пика		№ образца	Площадь пика			
		ДЕЗ	ТРИ		ДЕЗ			ТРИ
L	1	8245	612946	1	7028	546324	0,85	0,89
	2	7425	637511	2	5874	551176	0,79	0,86
	3	7382	623029	3	7305	544790	0,99	0,87
	4	7158	603990	4	6153	530777	0,86	0,88
	5	7446	626699	5	6709	546969	0,90	0,87
	6	8074	600315	6	6110	528091	0,76	0,88
H	1	458523	598638	1	455429	510452	0,99	0,85
	2	457690	580162	2	442532	499027	0,97	0,86
	3	438494	565385	3	436230	535313	0,99	0,95
	4	437370	609278	4	430797	527427	0,98	0,87
	5	454393	569276	5	438822	512599	0,97	0,90
	6	453341	605556	6	455783	516082	1,01	0,85

Таблица 40 – Расчёт фактора матрицы лапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием интактной цельной крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ЛАП	Mf ТРИ	Mf ЛАП	Mf ТРИ		
1	0,85	0,89	1,02	0,85	0,95	1,20
2	1,00	0,86	0,99	0,86	1,16	1,15
3	0,92	0,87	1,05	0,95	1,05	1,10
4	0,77	0,88	1,00	0,87	0,87	1,16
5	0,80	0,87	1,00	0,90	0,92	1,11
6	1,01	0,88	1,01	0,85	1,15	1,19
Среднее					1,02	1,15
CV, %					11,98	3,37

Таблица 41 – Расчёт фактора матрицы лапаконитина на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы тримебутина для образцов, приготовленных с использованием интактной цельной крови

№	Уровень L		Уровень H		Нормализованный Mf, уровень L	Нормализованный Mf, уровень H
	Mf ЛАП	Mf ТРИ	Mf ЛАП	Mf ТРИ		
1	0,85	0,89	0,99	0,85	0,96	1,16
2	0,79	0,86	0,97	0,86	0,92	1,12
3	0,99	0,87	0,99	0,95	1,13	1,05
4	0,86	0,88	0,98	0,87	0,98	1,14
5	0,90	0,87	0,97	0,90	1,03	1,07
6	0,76	0,88	1,01	0,85	0,86	1,18
Среднее					0,98	1,12
CV, %					9,68	4,54

Фактор матрицы рассчитывался как отношение значения площади пика анализируемого вещества на хроматограмме образца, приготовленного с использованием интактной цельной крови после осаждения белков (учитывает влияние биологической матрицы, но не учитывает степень извлечения), к

значению площади пика анализируемого вещества на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали, как отношение значения фактора матрицы анализируемого вещества к фактору матрицы внутреннего стандарта. Коэффициент вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, не превышал 15,00 %. Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.2.5 Степень извлечения

Для оценки эффекта матрицы анализировали по 3 образца без влияния степени извлечения из биологической матрицы на уровнях L, M и H, приготовленные с использованием интактной цельной крови, и по 3 образца контроля качества на уровнях L, M и H (образцы с учетом влияния степени извлечения из биологической матрицы) (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Полученные результаты приведены в таблицах 42–44.

Таблица 42 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов без учета влияния степени извлечения анализируемых веществ из цельной крови

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ ТРИ
L	1	3831	7028	546324	0,007	0,013
	2	4444	5874	551176	0,008	0,011
	3	3576	7305	544790	0,007	0,013
M	1	39847	131241	534978	0,074	0,245
	2	38651	133304	534100	0,072	0,250
	3	38760	131896	529810	0,073	0,249
H	1	133561	455429	510452	0,262	0,892
	2	131758	442532	499027	0,264	0,887

Продолжение Таблицы 42

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ ТРИ
	3	131330	436230	535313	0,245	0,815

Таблица 43 – Расчёт отношения площадей пиков лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина к площадям пиков тримебутина для образцов с учетом влияния степени извлечения анализируемых веществ из цельной крови

Уровень №	Образец №	Площадь пика			Отношение площадей пиков	
		ЛАП	ДЕЗ	ТРИ	ЛАП/ТРИ	ДЕЗ/ ТРИ
L	1	4167	7983	536690	0,008	0,015
	2	4338	8193	554459	0,008	0,015
	3	4558	7726	544462	0,008	0,014
M	1	49110	174626	535884	0,092	0,326
	2	49780	165422	537817	0,093	0,308
	3	47834	164828	556871	0,086	0,296
H	1	139973	468241	537124	0,261	0,872
	2	139406	473612	517188	0,270	0,916
	3	139692	482599	538497	0,259	0,896

Таблица 44 – Расчет относительного стандартного отклонения степени извлечения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина из биологических матриц

Вид биологической матрицы	Степень извлечения лапаконитина, %			Степень извлечения N-дезацетиллапаконитина, %		
	Уровень L	Уровень M	Уровень H	Уровень L	Уровень M	Уровень H
Цельная кровь	110,72	123,04	99,60	115,63	132,83	97,71
	97,04	127,90	102,09	138,65	123,24	103,27
	127,54	117,41	105,74	105,83	118,90	109,98
Среднее	111,77	122,79	102,47	120,04	124,99	103,65
RSD, %	13,67	4,28	3,01	14,04	5,71	5,93

Относительной стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина из биологических матриц не превышало 15,00 %. Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.2.6 Перенос пробы

Перенос пробы оценивали путем последовательной инъекции модельного образца № 8 (серия модельных образцов № 2, таблица 7) и образца интактной цельной крови. На хроматограмме образца интактной цельной крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина и тримебутина. Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.3 Выбор биологической матрицы для последующего анализа

Для оценки выбора биологической матрицы в качестве объекта исследования проводили сравнительную оценку селективности, эффекта матрицы, степени извлечения при проведении валидации методики в плазме крови человека и в цельной крови человека.

Оценка валидационного параметра «Селективность» с использованием интактной плазмы крови человека (интактной гиперлипидемической плазмы крови человека, интактной гемолизной плазмы крови человека), а также интактной цельной крови человека показала идентичные результаты, а именно отсутствие сигналов, соответствующих временам удерживания лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина и тримебутина.

При оценке валидационного параметра «Эффект матрицы» с использованием интактной плазмы крови (интактной гемолизной плазмы крови, интактной гиперлипидемической плазмы крови), а также интактной цельной

крови было установлено, что полученные значения коэффициентов вариации фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, не превышали 15,00 %. Полученные результаты приведены в таблице 45.

Таблица 45 – Сравнение влияния биологической матрицы на определение лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина

Методика определения лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина в плазме крови человека			Методика определения лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина в цельной крови человека	
CV, среднее значение, %	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
		6,80	6,47	7,68

При оценке валидационного параметра «Степень извлечения» с использованием интактной плазмы крови (интактной гемолизной плазмы крови, интактной гиперлипидемической плазмы крови), а также интактной цельной крови было установлено, что значения относительного стандартного отклонения рассчитанных значений степени извлечения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина из биологических матриц не превышали 15,00 %. Полученные результаты представлены в таблице 46.

Таблица 46 – Сравнение воспроизводимости степени извлечения лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина из различных биологических матриц

Методика определения лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина в плазме крови человека			Методика определения лапаконитина, N-дезацетиллапаконитина в цельной крови человека	
RSD, среднее значение, %	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
		13,31	10,21	6,99

Исходя из полученных результатов, можно отметить, что обе биологические матрицы (плазма крови человека и цельная кровь человека) являются пригодными для анализа лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина, поскольку на хроматограммах интактных образцов не было обнаружено сигналов, соответствующих сигналам анализируемых веществ и внутреннего стандарта (тримебутина). При оценке параметра «Эффект матрицы» было выявлено, что

плазма крови оказывает меньшее влияние на вариабельность степени ионизации анализируемых веществ и внутреннего стандарта (тримебутин) в камере ионизации масс-спектрометрического детектора (6,80 % для лаппаконитина и 6,47 % для N-дезацетиллаппаконитина) по сравнению с цельной кровью (7,68 % для лаппаконитина и 7,11 % для N-дезацетиллаппаконитина). Однако при оценке параметра «Степень извлечения» было установлено, что результаты степени извлечения анализируемых веществ и внутреннего стандарта (тримебутин) из цельной крови являются более воспроизводимыми (6,99 % для лаппаконитина и 8,56 % для N-дезацетиллаппаконитина) в сравнении с результатами степени извлечения исследуемых веществ из плазмы крови (13,31 % для лаппаконитина и 10,21 % для N-дезацетиллаппаконитина).

В связи с неоднозначностью полученных результатов 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 [118, 119], 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 [120]. В связи с этим было принято решение использовать плазму крови человека в качестве биологической матрицы для проведения второго этапа валидации, а также далее аналитического этапа исследования.

3.2.4 Валидация методики, плазма крови человека, этап 2

3.2.4.1 Градуировочная кривая

В рамках валидационных циклов № 2 и № 3 проводили анализ образцов, соответствующих калибровочным уровням 1–8, указанным в таблице 7 (серия модельных растворов № 2). По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика лаппаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации лаппаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика N-дезацетиллаппаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации N-дезацетиллаппаконитина к концентрации тримебутина в плазме крови. Параметры уравнений калибровочных кривых приведены в таблице 47 для лаппаконитина и в таблице 48 для N-дезацетиллаппаконитина.

Таблица 47 – Параметры калибровочной кривой для лаппаконитина

№ валидационного цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
2	0,0482683	-0,000485842	0,9956304
3	0,0479179	-0,000647207	0,9956292

Таблица 48 – Параметры калибровочной кривой для N-дезацетиллаппаконитина

№ валидационного цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
2	0,0885119	-0,00274132	0,9982361
3	0,0917619	-0,00262678	0,9977505

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют критерию приемлемости (не менее 0,99).

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений соответствовали критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114] (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). Полученные результаты приведены в таблице 49 и в таблице 50.

Таблица 49 – Расчет относительной погрешности, валидационный цикл № 2

Уровень №	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, нг/мл		Относительная погрешность, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
1	0,50	0,50	0,50	0,48	0,00	-4,00
2	1,00	1,00	1,05	1,09	5,00	9,00
3	3,00	5,00	2,64	5,03	-12,00	0,60
4	9,00	10,00	8,04	9,36	-10,67	-6,40
5	15,00	25,00	15,14	24,65	0,93	-1,40
6	25,00	50,00	28,17	53,35	12,68	6,70
7	35,00	75,00	37,08	74,00	5,94	-1,33
8	50,00	100,00	49,21	96,97	-1,58	-3,03

Таблица 50 – Расчет относительной погрешности, валидационный цикл № 3

Уровень №	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, нг/мл		Относительная погрешность, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
1	0,50	0,50	0,52	0,48	4,00	-4,00
2	1,00	1,00	0,96	1,06	-4,00	6,00
3	3,00	5,00	2,69	5,34	-10,33	6,80
4	9,00	10,00	8,14	9,31	-9,56	-6,90
5	15,00	25,00	15,30	23,73	2,00	-5,08
6	25,00	50,00	28,35	53,89	13,40	7,78
7	35,00	75,00	37,74	74,80	7,83	-0,27
8	50,00	100,00	48,34	94,83	-3,32	-5,17

3.2.4.2 Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих уровням LLOQ, L, M, H (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 вводов образца для каждого уровня концентраций лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательностей (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Результаты приведены в таблицах 51–53.

Таблица 51 – Расчет точности и прецизионности методики внутри валидационного цикла № 1

Уровень	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, среднее значение (n=5), нг/мл		RSD (n=5), %		E, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
LLOQ	0,50	0,50	0,52	0,50	5,14	8,12	4,40	0,00
L	1,50	1,50	1,37	1,45	0,80	3,17	-8,80	-3,07
M	15,00	30,00	13,69	27,19	3,54	2,78	-8,76	-9,37
H	40,00	80,00	37,39	73,61	1,60	2,01	-6,52	-7,99

Таблица 52 – Расчет точности и прецизионности методики между валидационными циклами № 1 и № 2

Уровень	Номинальная концентрация, нг/мл		Рассчитанная концентрация, среднее значение (n=10), нг/мл		RSD (n=5), %		E, %	
	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ	ЛАП	ДЕЗ
LLOQ	0,50	0,50	0,52	0,50	6,62	5,70	4,20	-0,20
L	1,50	1,50	1,36	1,40	1,78	5,63	-9,60	-6,80
M	15,00	30,00	13,70	27,24	3,16	2,20	-8,66	-9,19
H	40,00	80,00	38,02	74,22	2,36	1,63	-4,95	-7,23

Таблица 53 – Расчет точности и прецизионности методики между валидационными циклами № 1, № 2 и № 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

Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %) на уровне между циклами использовались данные (n=15), полученные в течение 1-й последовательности (внутри цикла) 2-й и 3-й последовательностей (между циклами).

Полученные 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 согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.4.3 Стабильность

Были подтверждены следующие виды стабильностей:

- 1) краткосрочная – «настольная» стабильность (стабильность анализируемых веществ в течение пробоподготовки биологических образцов) при комнатной температуре в течение 6 часов;
- 2) краткосрочная – «постпрепаративная» стабильность (стабильность анализируемых веществ в течение хранения пробоподготовленных биологических

образцов в автосамплере хроматографа) при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 24 часов;

3) стабильность анализируемых веществ при трехкратной заморозке-разморозке биологических образцов при температуре от -40 °С до -35 °С в течение 36 часов (суммарное время) в условиях заморозки и при комнатной температуре в течение 6 часов (суммарное время) в условиях разморозки;

4) стабильность стандартных растворов анализируемых веществ при температуре от -40 °С до -35 °С в течение 20 дней;

5) долгосрочная стабильность (стабильность анализируемых веществ в составе биологических образцов в течение периода с момента начала отбора образцов плазмы от добровольцев в клиническом центре до анализа последнего образца в аналитической лаборатории) при температуре от -40 °С до -35 °С в течение 50 дней.

Для полученных значений концентраций анализируемых веществ была рассчитана относительная погрешность (таблица 54, таблица 55).

Таблица 54 – Оценка различных видов стабильностей лаптаконитина в образцах на уровнях L и H

Введено, нг/мл	Уровень L	Уровень H	E, % –	E, % –
	1,50	40,00	уровень L	уровень H
Найдено, нг/мл – образцы для оценки «настойной» стабильности	1,32	42,36	-12,00	5,90
	1,39	42,21	-7,33	5,53
	1,28	40,91	-14,67	2,27
Среднее значение, нг/мл	1,33	41,83	-11,33	4,57
Найдено, нг/мл – образцы для оценки «постпрепаративной» стабильности	1,30	39,74	-13,33	-0,65
	1,29	39,03	-14,00	-2,43
	1,39	38,26	-7,33	-4,35
Среднее значение, нг/мл	1,33	39,01	-11,56	-2,48
Найдено, нг/мл – образцы для оценки стабильности при трехкратной заморозке-разморозке	1,31	37,85	-12,67	-5,38
	1,33	36,64	-11,33	-8,40
	1,39	37,82	-7,33	-5,45

Продолжение Таблицы 54

Введено, нг/мл	Уровень L	Уровень H	Е, % – уровень L	Е, % – уровень H
	1,50	40,00		
Среднее значение, нг/мл	1,34	37,44	-10,44	-6,41
Найдено, нг/мл – образцы для оценки долгосрочной стабильности	1,34	38,46	-10,67	-3,85
	1,36	39,18	-9,33	-2,05
	1,33	41,52	-11,33	3,80
Среднее значение, нг/мл	1,34	39,72	-10,44	-0,70
Найдено, нг/мл – образцы для оценки стабильности стандартных растворов	1,48	37,91	-1,33	-5,23
	1,42	36,09	-5,33	-9,77
	1,43	39,11	-4,67	-2,23
Среднее значение, нг/мл	1,44	37,70	-3,78	-5,74

Таблица 55 – Оценка различных видов стабильностей N-дезацетиллапаконитина в образцах на уровнях L и H

Введено, нг/мл	Уровень L	Уровень H	Е, % – уровень L	Е, % – уровень H
	1,50	80,00		
Найдено, нг/мл – образцы для оценки «настойной» стабильности	1,28	73,64	-14,67	-7,95
	1,44	75,58	-4,00	-5,53
	1,33	73,83	-11,33	-7,71
Среднее значение, нг/мл	1,35	74,35	-10,00	-7,06
Найдено, нг/мл – образцы для оценки «постпрепаративной» стабильности	1,43	74,96	-4,67	-6,30
	1,28	74,86	-14,67	-6,43
	1,31	74,30	-12,67	-7,13
Среднее значение, нг/мл	1,34	74,71	-10,67	-6,62
Найдено, нг/мл – образцы для оценки стабильности при трехкратной заморозке-разморозке	1,39	68,60	-7,33	-14,25
	1,45	69,79	-3,33	-12,76
	1,31	71,10	-12,67	-11,13
Среднее значение	1,38	69,83	-7,78	-12,71
Найдено, нг/мл – образцы для оценки долгосрочной стабильности	1,42	75,02	-5,33	-6,23
	1,39	73,88	-7,33	-7,65

Продолжение Таблицы 55

Введено, нг/мл	Уровень L	Уровень H	E, % – уровень L	E, % – уровень H
	1,50	80,00		
	1,44	74,54	-4,00	-6,82
Среднее значение, нг/мл	1,42	74,48	-5,56	-6,90
Найдено, нг/мл – образцы для оценки стабильности стандартных растворов	1,49	71,28	-0,67	-10,90
	1,43	73,99	-4,67	-7,51
	1,37	74,18	-8,67	-7,27
Среднее значение, нг/мл	1,43	73,15	-4,67	-8,56

Полученные значения относительной погрешности входили в диапазон от -15,00 % до 15,00 %, что соответствует критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114].

3.2.4.4 Отсутствие влияния разбавления образцов

Проводили анализ образцов плазмы крови с разбавлением в 2 раза интактной плазмой крови до получения концентраций, соответствующих уровням L и H (серия модельных образцов № 2, таблица 7). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения и относительной погрешности. Данные приведены в таблице 56 и в таблице 57.

Таблица 56 – Оценка точности и прецизионности при разбавлении образцов для лапаконитина

Уровень и № образца КК	Введено в хроматограф, нг/мл	Найдено, нг/мл	Найдено, среднее значение (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %
L – № 1	3,00	2,28	2,58	10,04	-14,13
L – № 2		2,76			
L – № 3		2,92			
L – № 4		2,48			
L – № 5		2,44			

Продолжение Таблицы 56

Уровень и № образца КК	Введено в хроматограф, нг/мл	Найдено, нг/мл	Найдено, среднее значение (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %
Н – № 1	80,00	73,56	74,82	2,02	-6,47
Н – № 2		76,24			
Н – № 3		73,96			
Н – № 4		73,68			
Н – № 5		76,68			

Таблица 57 – Оценка точности и прецизионности при разбавлении образцов для N-дезацетиллаппаконитина

Уровень и № образца КК	Введено в хроматограф, нг/мл	Найдено, нг/мл	Найдено, среднее значение (n=5), нг/мл	RSD (n=5), %	E, %
L – № 1	3,00	2,28	3,32	5,78	10,67
L – № 2		2,76			
L – № 3		2,92			
L – № 4		2,48			
L – № 5		2,44			
Н – № 1	160,00	73,56	143,82	1,92	-10,11
Н – № 1		76,24			
Н – № 1		73,96			
Н – № 1		73,68			
Н – № 1		76,68			

Полученные величины относительного стандартного отклонения для оценки прецизионности (не более 15,00 %) и относительной погрешности для оценки точности (в диапазоне от -15,00 % до 15,00 %) соответствуют критериям приемлемости согласно нормативной документации [105, 112–114]. Таким образом, показана возможность разбавления образцов в 2 раза при необходимости (если значения концентраций лаппаконитина и/ или N-дезацетиллаппаконитина превышают ВПКО методики).

3.3 Аналитический этап исследования

Аналитический этап исследования фармакокинетики препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) проводился в рамках исследования сравнительной фармакокинетики препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) и аналогичного препарата отечественного производителя.

В рамках проведения клинического этапа исследования в клиническом центре сотрудниками клинического центра был произведен подбор здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 18 до 45 лет включительно. Добровольцам устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер на 12 часов. После установки катетера за 5–10 минут до приема препарата отбиралась исходная (0) проба крови. Под наблюдением специалистов добровольцы однократно принимали исследуемый препарат в дозе 25 мг (1 таблетка утром натощак, запивая 200 мл столовой воды (без газа). Дальнейший отбор проб крови для изучения фармакокинетики проводился через 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 80 минут, 1,5 часа, 2 часа, 2,5 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 7 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часа и 48 часов после приема исследуемого препарата согласно протоколу клинического исследования. Далее отобранные образцы крови центрифугировали и затем отбирали плазму крови в отдельные промаркированные пробирки. Все образцы плазмы крови замораживали, хранили и транспортировали в аналитическую лабораторию при температуре не выше минус 20 °С.

В аналитической лаборатории в рамках проведения аналитического этапа исследования был произведен анализ образцов от добровольцев по ранее разработанной и валидированной методике в соответствии с актуальной нормативной документацией [105, 112–114]. В ходе исследования было выполнено 11 аналитических циклов, в состав каждого из которых были включены калибровочные образцы, образцы контроля качества и исследуемые образцы от 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. Параметры построенных калибровочных кривых (линейная функция) приведены в таблице 57 для лаппаконитина и в таблице 59 для N-дезацетиллаппаконитина.

Таблица 58 – Параметры калибровочной кривой для лаппаконитина

№ аналитического цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
1	0,0410206	0,000364435	0,9963856
2	0,0424578	-0,000576860	0,9972994
3	0,0605227	-0,000510441	0,9965463
4	0,0577709	-0,000355081	0,9960366
5	0,0482536	-0,000972619	0,9989142
6	0,0505421	0,000228423	0,9978073
7	0,0556945	-0,000734899	0,9977945
8	0,0502029	-0,000572232	0,9963360
9	0,0493017	-0,0000831874	0,9968744
10	0,0508654	0,000214192	0,9963730
11	0,0826491	-0,000460337	0,9975480

Таблица 59 – Параметры калибровочной кривой для N-дезацетиллаппаконитина

№ аналитического цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
1	0,0698302	-0,00141177	0,9935089
2	0,0708492	-0,000463209	0,9965600
3	0,100638	-0,00208960	0,9978967
4	0,101433	-0,00259274	0,9964657
5	0,0897054	-0,00124624	0,9972553
6	0,0815694	-0,00155923	0,9968072
7	0,0885851	-0,00192953	0,9973508
8	0,0799770	-0,00121157	0,9954716
9	0,0799141	-0,00195502	0,9987763

Продолжение Таблицы 59

№ аналитического цикла	Коэффициент k	Коэффициент b	Коэффициент корреляции
10	0,0795253	-0,000738425	0,9972602
11	0,0983269	-0,0000349469	0,9954038

Дополнительно был произведен расчет относительной погрешности и относительного стандартного отклонения концентраций образцов контроля качества между 11 аналитическими циклами. Относительная погрешность рассчитанных концентраций образцов контроля качества укладывалась в диапазон от -15,00 % до 15,00 % для каждого уровня концентраций. Полученные результаты приведены в таблице 60 для лапаконитина и в таблице 61 для N-дезацетиллапаконитина.

Таблица 60 – Оценка точности и прецизионности концентраций образцов контроля качества – лапаконитин

Рассчитанные параметры	Найдено		
	Уровень L	Уровень M	Уровень H
Среднее значение, нг/мл	1,39	14,89	41,09
E, %	-7,21	-0,75	2,72
RSD, %	6,93	7,20	7,27

Таблица 61 – Оценка точности и прецизионности концентраций образцов контроля качества – N-дезацетиллапаконитин

Рассчитанные параметры	Найдено		
	Уровень L	Уровень M	Уровень H
Среднее значение, нг/мл	1,53	31,27	84,74
E, %	1,98	4,23	5,92
RSD, %	8,94	7,27	7,30

Результаты анализа исследуемых образцов, полученных от здоровых добровольцев приведены в таблицах 62–64 для лапаконитина и в таблицах 65–67 для N-дезацетиллапаконитина.

Таблица 65 – Концентрации N-дезацетиллаппаконитина, полученные от добровольцев (рандомизационные номера 1–8)

Время отбора образца	Рандомизационный номер добровольца								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Полученные значения концентраций, нг/мл								
0,00 ч.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25 ч.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00	0,57	0,00	0,00
0,50 ч.	2,12	0,75	2,65	0,86	0,63	0,69	3,93	1,10	1,15
0,75 ч.	2,06	2,22	3,13	4,22	1,65	1,85	4,51	2,35	2,18
1,00 ч.	3,22	2,57	2,68	7,52	3,37	2,57	7,95	2,42	2,51
1,33 ч.	5,16	3,27	2,67	6,04	3,32	3,05	8,42	2,41	3,52
1,50 ч.	5,39	4,63	3,09	12,02	3,70	3,92	6,75	2,63	3,82
2,00 ч.	6,88	3,99	3,25	10,42	2,33	4,43	8,12	3,81	4,69
2,50 ч.	6,29	7,08	6,02	13,77	4,00	5,04	10,15	4,47	5,38
3,00 ч.	7,46	5,05	8,31	17,81	4,86	5,76	10,19	3,97	4,06
4,00 ч.	9,91	5,23	7,82	14,54	7,99	4,76	11,44	6,68	4,46
5,00 ч.	8,25	7,15	6,70	13,27	6,99	5,70	8,37	3,60	3,56
7,00 ч.	6,27	3,52	4,52	9,87	4,61	7,28	7,17	4,84	3,61
8,00 ч.	5,33	5,13	4,31	8,71	3,95	4,12	8,81	3,38	3,31
12,00 ч.	9,99	5,06	5,38	11,53	1,41	3,54	9,23	6,19	2,59
24,00 ч.	2,41	1,98	0,90	4,70	0,80	1,05	2,58	2,45	1,29
48,00 ч.	0,51	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00

Таблица 66 – Концентрации N-дезацетиллаппаконитина, полученные от добровольцев (рандомизационные номера 9–18)

Время отбора образца	Рандомизационный номер добровольца								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Полученные значения концентраций, нг/мл								
0,00 ч.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25 ч.	0,00	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,50 ч.	0,75	0,59	1,96	3,64	6,71	3,21	0,77	3,25	0,00
0,75 ч.	1,90	1,81	3,03	14,06	14,40	4,94	1,57	3,65	1,24
1,00 ч.	2,69	3,54	4,17	12,75	13,70	5,45	2,05	7,57	2,60
1,33 ч.	4,71	3,86	6,87	12,11	15,99	7,81	2,32	12,69	2,47
1,50 ч.	3,11	5,07	6,87	12,48	19,59	7,15	2,24	10,08	3,36
2,00 ч.	2,97	7,81	12,40	20,51	26,77	14,55	3,28	11,84	4,07
2,50 ч.	4,60	8,89	14,35	20,83	24,57	10,65	2,64	20,58	6,48
3,00 ч.	5,61	6,99	12,73	13,16	26,90	9,32	2,66	19,81	7,47
4,00 ч.	4,27	8,03	13,89	15,90	29,34	6,09	4,49	13,18	8,96
5,00 ч.	5,44	6,56	14,86	14,56	28,25	8,84	3,52	20,15	9,77
7,00 ч.	3,02	4,61	14,49	13,90	17,58	4,97	2,38	14,08	7,40
8,00 ч.	3,72	4,39	12,87	15,13	13,62	8,11	4,28	12,35	7,38
12,00 ч.	3,00	6,86	14,24	9,03	20,70	3,26	2,64	9,86	8,27
24,00 ч.	1,09	2,69	11,29	3,28	6,81	1,09	0,79	4,57	2,15
48,00 ч.	0,00	0,00	1,51	0,59	3,22	0,00	0,00	1,15	0,00

Таблица 67 – Концентрации N-дезацетиллапаконитина, полученные от добровольцев (рандомизационные номера 19–27)

Время отбора образца	Рандомизационный номер добровольца									
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	Полученные значения концентраций, нг/мл									
0,00 ч.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25 ч.	0,00	0,00	0,57	0,00	0,64	0,00	1,44	0,00	0,00	0,00
0,50 ч.	1,09	1,23	3,54	0,00	5,91	2,08	5,22	1,55	0,94	2,07
0,75 ч.	1,79	2,72	3,54	3,03	4,78	2,85	6,67	2,92	2,81	4,33
1,00 ч.	3,90	3,05	7,35	3,97	8,59	2,19	9,13	2,26	3,31	3,58
1,33 ч.	12,39	2,94	9,69	4,16	8,80	4,97	7,51	2,73	4,28	3,64
1,50 ч.	11,76	3,16	12,73	4,72	14,06	4,02	10,81	5,56	4,64	5,37
2,00 ч.	13,78	3,80	6,75	6,96	24,01	6,99	5,99	6,48	6,82	5,61
2,50 ч.	14,34	4,03	10,83	5,49	19,98	9,76	13,84	7,15	9,64	4,97
3,00 ч.	12,50	4,03	11,60	7,17	22,27	9,24	10,74	7,61	7,22	5,64
4,00 ч.	15,37	3,65	12,67	9,91	20,77	8,69	11,06	6,29	7,41	3,94
5,00 ч.	9,89	2,93	8,27	10,73	21,18	10,21	8,43	7,76	5,88	6,59
7,00 ч.	10,91	3,23	6,57	9,84	19,13	10,06	9,10	4,15	4,77	5,78
8,00 ч.	9,11	3,18	7,48	6,74	19,29	10,79	10,96	6,62	3,70	5,50
12,00 ч.	4,93	3,22	10,04	8,71	14,40	6,63	9,36	5,97	8,77	5,09
24,00 ч.	1,68	0,70	3,17	1,99	5,10	1,23	3,76	2,09	2,66	1,54
48,00 ч.	0,00	0,00	0,56	0,00	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Пример хроматограммы исследуемого образца от добровольца представлена на рисунке 21.

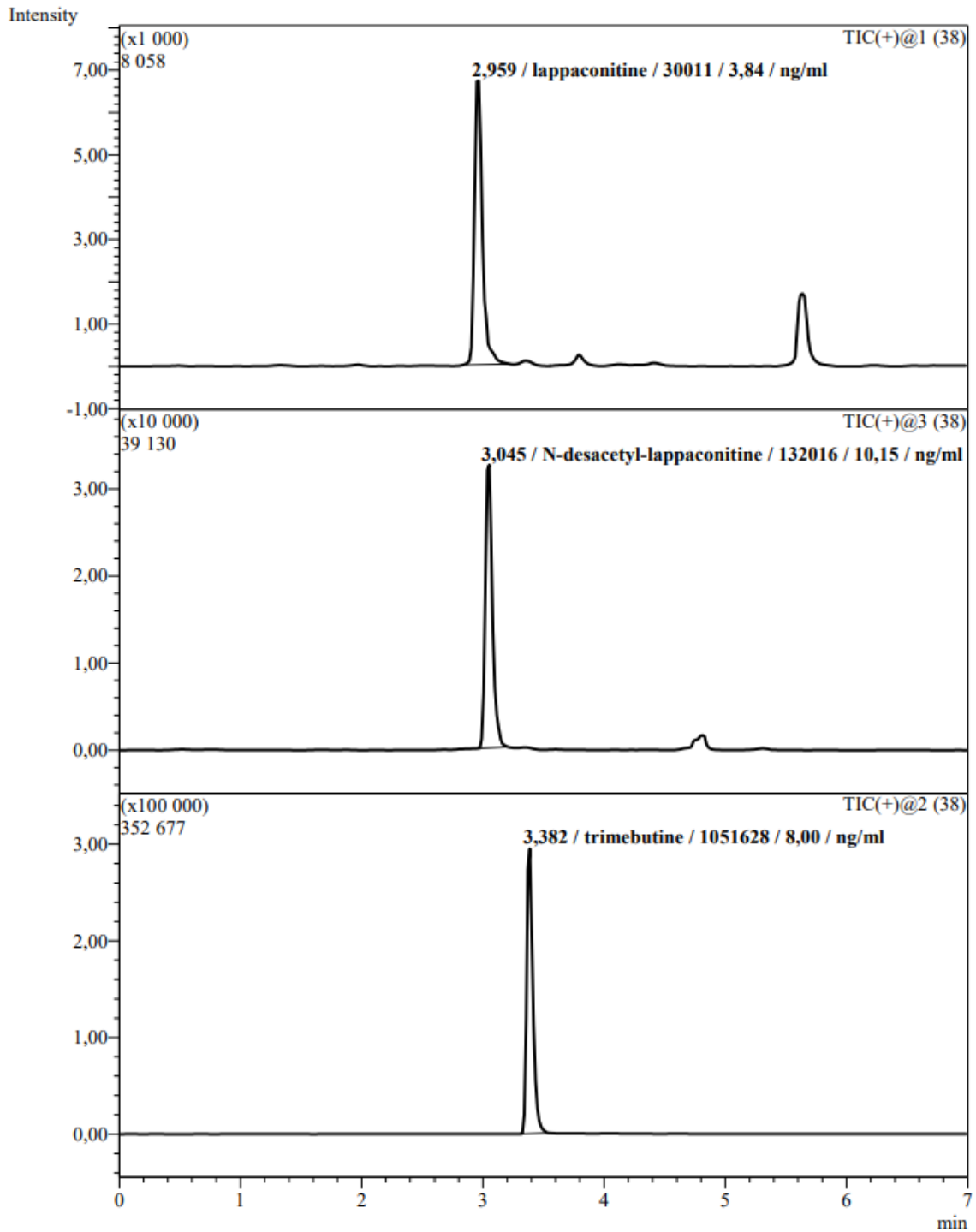


Рисунок 21 – Хроматограмма исследуемого образца от добровольца (рандомизационный номер добровольца 7, время отбора образца 2,5 ч.) (первый сектор TIC@1 хроматограммы – условия детектирования лаппаконитина; второй сектор TIC@3 хроматограммы – условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина; третий сектор TIC@2 хроматограммы – условия детектирования тримебутина)

После проведения полного анализа образцов от добровольцев в рамках 11 аналитического цикла был проведен повторный выборочный анализ испытуемых образцов для подтверждения достоверности полученных результатов. Для оценки количества образцов, которые подлежат данному испытанию, руководствовались следующим принципом: необходимо отобрать не менее 10,00 % от общего количества образцов, если это значение не превышает 1000. Поскольку в рамках данного исследования было проанализировано 952 образца, то количество образцов, подлежащих повторному выборочному анализу, составило 96. Согласно нормативной документации, относительная погрешность полученных результатов анализа не менее чем для 67,00 % образцов должна укладываться в диапазон от -20,00 % до 20,00 % [105, 112–114]. Количество образцов, удовлетворяющих данному критерию, составило для лаппаконитина 89,69 %, для N-дезацетиллаппаконитина 86,60 %.

3.4 Фармакокинетический этап исследования

Фармакокинетический этап исследования препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) проводился на основании данных, полученных в рамках проведения аналитического этапа исследования [121].

Фармакокинетические параметры лаппаконитина. Среднее значение максимальных концентраций (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев после приема исследуемого препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), составляет $5,09 \pm 4,07$ нг/мл ($Mean \pm SD$). Время достижения максимальной концентрации лаппаконитина (T_{max}) составляет $4,43 \pm 3,54$ часа. Средние значения площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) и площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) исследуемого препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг

(АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), составляют $42,96 \pm 34,48$ нг·ч/мл и $71,24 \pm 43,20$ нг·ч/мл, соответственно. Исследуемый препарат элиминировался из плазмы крови со средним значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $8,45 \pm 5,10$ часа (таблица 1).

Фармакокинетические параметры N-дезацетиллаппаконитина. Среднее значение максимальных концентраций (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев после приема исследуемого препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), составляет $11,66 \pm 6,21$ нг/мл (Mean \pm SD). Время достижения максимальной концентрации N-дезацетиллаппаконитина (T_{max}) составляет $4,04 \pm 2,18$ часа. Средние значения площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) и площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) исследуемого препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) составляют $167,42 \pm 114,41$ нг·ч/мл и $189,42 \pm 115,20$ нг·ч/мл, соответственно. Исследуемый препарат элиминировался из плазмы крови со средним значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $9,04 \pm 2,57$ часа (таблица 68, таблица 69).

Таблица 68 – Сводная таблица фармакокинетических параметров лаппаконитина после однократного приема натощак исследуемого препарата Аллафорте[®], 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 ⁻¹	$T_{1/2}$, ч
Количество	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 69 – 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 ⁻¹	$T_{1/2}$, ч
Количество	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 и полулогарифмических координатах) лаппаконитина и его метаболита N-дезацетиллаппаконитина после приема исследуемого препарата приведены на рисунках 22 и 23, соответственно.

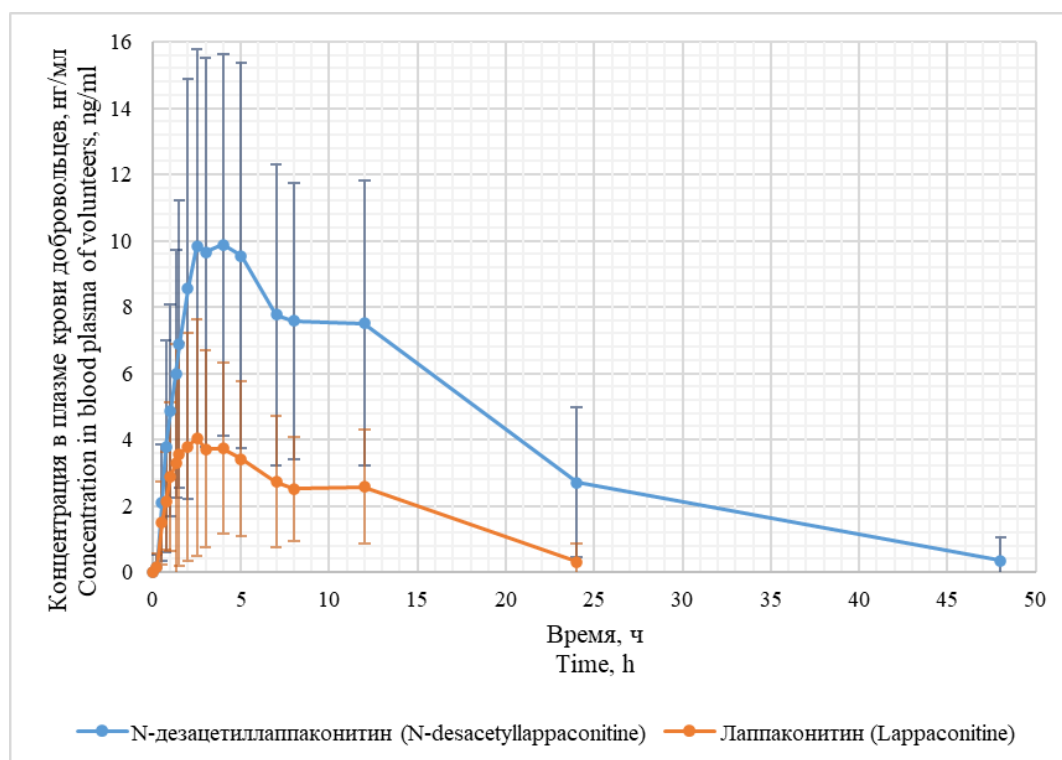


Рисунок 22 – Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах со стандартными отклонениями) ЛАП и ДЕЗ после однократного

приема исследуемого препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия)

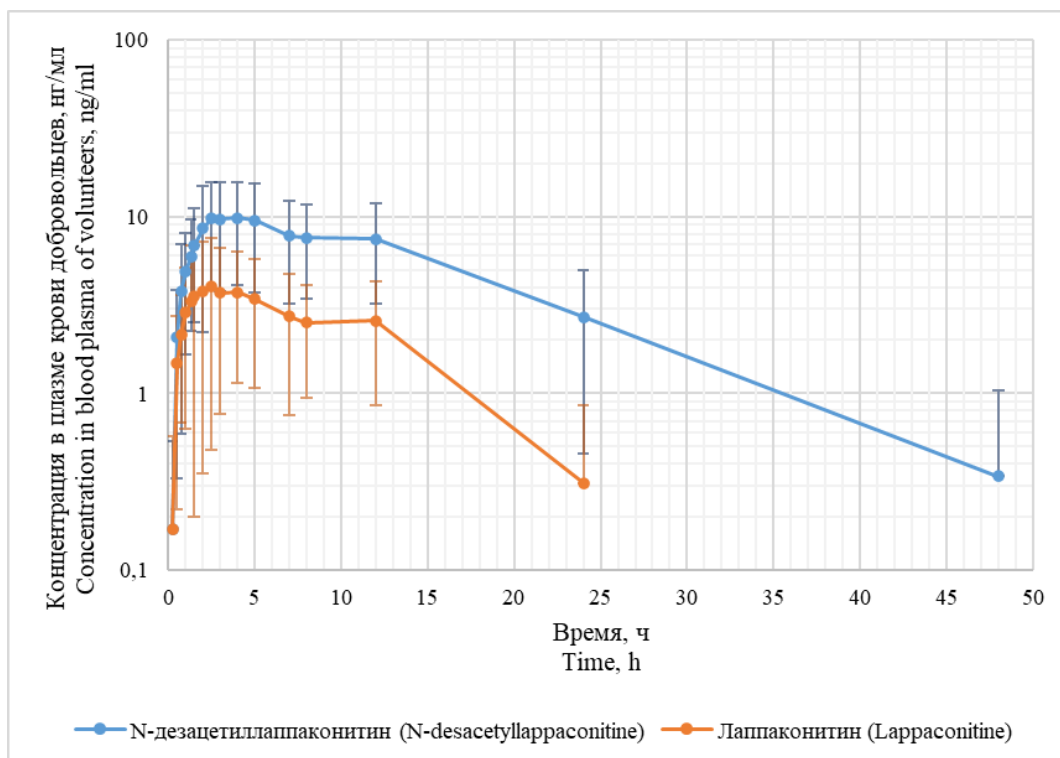


Рисунок 23 – Усредненные фармакокинетические профили (в полулогарифмических координатах со стандартными отклонениями) ЛАП и ДЕЗ после однократного приема исследуемого препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия)

На рисунках 15 и 16 показано, что препарат Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) предположительно имеет двухфазную кинетику элиминации лappaконитина и N-дезацетиллаппаконитина, однако это может быть связано с высокой вариабельностью значений T_{max} лappaконитина ($CV = 79,84 \%$) и N-дезацетиллаппаконитина ($CV = 53,94 \%$), а также большим разбросом индивидуальных значений (от 0,75 часов до 12 часов для лappaконитина; от 1,5 часов до 12 часов для N-дезацетиллаппаконитина).

Также можно отметить, что при приеме препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) отсутствуют существенные различия в T_{max} лappaконитина и T_{max} N-дезацетиллаппаконитина (критерий Вилкоксона, $p > 0,05$). Это может приводить к

усилению терапевтического эффекта в момент достижения максимальных концентраций лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина в плазме крови пациентов.

Площадь под фармакокинетической кривой N-дезацетиллапаконитина в 3,9 раза выше, чем у лапаконитина, что позволяет предположить низкую вероятность возникновения нежелательных лекарственных явлений, поскольку N-дезацетиллапаконитин обладает низкой токсичностью по сравнению с лапаконитином [122].

Также Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) 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 лапаконитина ($8,45 \pm 5,10$ часа). Для сравнения T_{max} и $T_{1/2}$ лапаконитина, входящего в состав препарата Аллапинин[®], составляют 1,5 часа и 1,17–2,4 часа соответственно [122]. Следовательно, применение препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) может снизить кратность дозирования.

Полученные результаты исследования фармакокинетики необходимо сопоставить с исследованиями фармакодинамики, что позволит скорректировать режим дозирования препарата Аллафорте[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) [123]. Однако значения периода полувыведения лапаконитина 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[®], таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) для обеспечения эффективной и безопасной терапии аритмий [14, 124–126].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

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

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 лапаконитина и N-дезацетиллапаконитина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС по параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, эффект матрицы, перенос пробы, стабильность, отсутствие влияния разбавления образцов. Результаты оценки данных валидационных параметров соответствовали критериям приемлемости.

4. Проведен анализ образцов здоровых добровольцев в рамках клинического исследования препаратов лапаконитина гидробромида. На основании полученных концентраций был проведен фармакокинетический этап исследования, который включал в себя расчет основных фармакокинетических параметров и построение усредненных фармакокинетических профилей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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 лапаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллапаконитина 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 лапаконитина 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 лаптаконитина и N-дезацетиллаптаконитина в образцах биологической матрицы здоровых добровольцев для лекарственного препарата Аллафорте[®], 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 лаптаконитина ($8,45 \pm 5,10$ часа), что позволяет снизить кратность дозирования при терапии аритмий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АО	– акционерное общество
АПП	– антиаритмический препарат
ВОЗ	– всемирная организация здравоохранения
ВС	– внутренний стандарт
ВЭЖХ-МС/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-селективным детектированием
ГИПК	– гемолизная интактная плазма крови
ГЛИПК	– гиперлипидемическая интактная плазма крови
ДЕЗ	– N-дезацетиллапаконитин
ЖЖЭ	– жидкость-жидкостная экстракция
ИПК	– интактная плазма крови
ИЦК	– интактная цельная кровь
К ₂ ЭДТА	– дикалиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
КК	– контроль качества
ЛАП	– лапаконитин
НПВС	– нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты
СИ	– степень извлечения
СО	– стандартный образец
ТРИ	– тримебутин
ТФЭ	– твердофазная экстракция
ЦНС	– центральная нервная система
AUC _{0-t}	– площадь под кривой «концентрация – время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t
AUC _{0-∞}	– площадь под кривой «концентрация – время» с момента

	приема лекарственного препарата до бесконечности
C_{\max}	– максимальная концентрация лекарственного вещества
COVID-19	– новая коронавирусная инфекция (coronavirus disease 2019)
CV	– коэффициент вариации
E	– относительная погрешность
H	– верхний уровень
L	– нижний уровень
LLOQ	– нижний предел количественного определения
M	– средний уровень
Mf	– фактор матрицы
RSD	– относительное стандартное отклонение
SARS-CoV-2	– коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2)
T_{\max}	– время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества в биологической матрице
$T_{1/2}$	– период полувыведения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьян, А. Н. Антиаритмические препараты: механизмы действия, клинические эффекты, показания к применению / А. Н. Соловьян, Т. В. Михалева // Украинский кардиологический журнал. – 2019. – Т. 26, № 2. – С. 76–90. DOI: 10.31928/1608-635X-2019.2.7690.
2. Затонская, Е. В. Эпидемиология аритмий (обзор данных литературы) / Е. В. Затонская, Г. В. Матюшин, Н. Г. Гоголашвили, Н. Н. Новгородцева // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – № 3(99). – С. 5–16.
3. Филатов, А. Г. Эпидемиология и социальная значимость фибрилляции предсердий / А. Г. Филатов, Э. Г. Тарашвили // Анналы аритмологии. – 2012. – Т. 9, № 2. – С. 5–13.
4. Рыбакова, Т. А. Оценка эффективности антиаритмической монотерапии лаптаконитином гидробромидом, метопрололом и амиодароном с учетом показателей вариабельности сердечного ритма у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий исходно и через 1 год / Т. А. Рыбакова, В. В. Столярова // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – Т. 4. – С. 119-131. DOI: 10.17513/spno.31954.
5. Канорский, С. Г. Выбор стратегии контроля синусового ритма у больных с фибрилляцией предсердий: почему, когда и как. Обзор литературы / С. Г. Канорский // Вестник аритмологии. – 2023. – Т. 30, № 1(111). – С. 52–60. DOI: 10.35336/VA-2023-1-07.
6. Закиров, Н. У. Кардиология в Беларуси / Н. У. Закиров, О. С. Салаев, Х. Ш. Кучкаров, Р. Д. Курбанов // Кардиология. – 2022. – Т. 14, № 3. – С. 300–312. DOI: 10.34883/PI.2022.14.3.005.
7. Мареев, Ю. В. ЭПОХА: Эпидемиология фибрилляции предсердий в репрезентативной выборке Европейской части Российской Федерации / Ю. В. Мареев, Д. С. Поляков, Н. Г. Виноградова [и др.] // Кардиология. – 2022. – Т. 62, № 4. – С. 12-19. DOI: 10.18087/cardio.2022.4.n1997.

8. Sanoev, Z. I. Antiarrhythmic activity of N-Deacety lappaconitine when administered orally / Z. I. Sanoev, T. T. Khamroev, F. N. Djaxangirov [et al.] // *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. – 2021. – Vol. 25, No. 2. – P. 2339–2346.
9. Cardiovascular Diseases (CVDs) // World Health Organization. – URL: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (Accessed: 14.01.2024).
10. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019 // World Health Organization. – URL: <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019> (Accessed: 14.01.2024).
11. Дарбаева, Н. А. Аритмия. Этиология заболевания, особенности протекания аритмии / Н. А. Дарбаева, О. Т. К. Нишанбаева, М. А. Ниязбекова // Сборник трудов Международной научно-практической конференции «Современная наука, общество и образование: актуальные вопросы, достижения и инновации». – Пенза: Наука и Просвещение, 2022. – С. 178–181.
12. Hong, B. Combination formulation of tetrodotoxin and lidocaine as a potential therapy for severe arrhythmias / B. Hong, J. He, Q. Le [et al.] // *Marine drugs*. – 2019. – Vol. 17, No. 12. – 685 p. DOI: 10.3390/md17120685.
13. Артюхина, Е. А. Этапный подход лечения пациента с ишемической болезнью сердца и желудочковыми аритмиями / Е. А. Артюхина, Е. Д. Стребкова, А. Ш. Ревшвили // *Российский кардиологический журнал*. – 2019. – № 3. – С. 101–105. DOI: 10.15829/1560-4071-2019-3-101-105.
14. Gui, Y. Direct analysis in real time-mass spectrometry for rapid quantification of five anti-arrhythmic drugs in human serum: application to therapeutic drug monitoring / Y. Gui, Y. Lu, S. Li [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-72490-w.
15. Мосейчук, К. А. Механизмы возникновения фибрилляции предсердий при COVID-19 / К. А. Мосейчук, Е. В. Филиппов // *Вестник аритмологии*. – 2023. – Т. 30, № 1. – С. e6-e11. DOI: 10.35336/VA-2023-1-11.

16. Аванесян, Г. А. Нарушения ритма сердца после COVID-19. Эпидемиология, этиология и патофизиология / Г. А. Аванесян, А. Г. Филатов // *Анналы аритмологии*. – 2023. – Т. 20, № 1. – С. 52–58. DOI: 10.15275/annaritmol.2023.1.6.
17. Турута, Я. Д. Особенности влияния инфекции COVID-19 на распространенность сердечных аритмий у пациентов / Я. Д. Турута, С. К. Броницкий. // *Тверской медицинский журнал*. – 2023. – № 6. – С. 79–82.
18. Ахмедова, Г. А. Эпидемиология, этиопатогенез миокардита, вызванного COVID-19 / Г. А. Ахмедова, Ш. Х. Зиядуллаев, С. К. Расулов // *Проблемы биологии и медицины*. – 2021. – № 3(128). – С. 222–228.
19. Мартынова, Т. А. Частота возникновения и течение фибрилляции предсердий на фоне инфекции COVID-19 / Т. А. Мартынова, А. Т. Бетуганова, З. А. Барханоева // *Клинический вестник ФМБЦ им. А.И. Бурназяна*. – 2023. – № 2. – С. 47–50. DOI: 10.33266/2782-6430-023-2-47-50.
20. Безделев, А. В. Анализ причин возникновения аритмий у больных COVID-19 по данным специализированного стационара / А. В. Безделев, А. Л. Миронова, А. А. Туличев // *Сборник тезисов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE»*. – Нижний Новгород: ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, 2021. – С. 202–203.
21. Бетуганова, А. Т. Частота возникновения и клиническое течение фибрилляции предсердий на фоне инфекции COVID-19 / А. Т. Бетуганова, З. А. Барханоева, Е. А. Праскурничий, Т. А. Мартынова // *Сборник материалов международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения 2023»*. – Москва: Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2023. – С. 106–107.
22. Дощицин, В. Л. Применение антиаритмических препаратов: рекомендации и реальная клиническая практика / В. Л. Дощицин, В. Л. Сыров, Т. В. Павлова // *Consilium Medicum*. – 2019. – Т. 21, № 10. – С. 86–94. DOI: 10.264442/20751753.2019.10.190441.

23. Плотников, А. В. Приведение регистрационных досье в соответствие с требованиями ЕАЭС — приоритет номер один для предприятий фармацевтической отрасли / А. В. Плотников, Т. А. Королева // Ремедиум. – 2022. – № 1. – С. 21–25. DOI:10.32687/1561-5936-2022-26-1-21-25.
24. Цорин, И. Б. Изучение электрофизиологических механизмов действия соединения ЛМГ-124 / И. Б. Цорин, В. П. Зинченко, И. Ю. Теплов [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2017. – № 2. – С. 4–11.
25. Рудакова, И. П. Оценка антиаритмической активности и безопасности новых производных морфолиноуксусной кислоты / И. П. Рудакова, О. В. Гашкова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – Т. 2, № 19. – С. 242–245.
26. Cheremnykh, K. P. Synthesis of hybrid molecules containing pyrimidine and diterpene alkaloid lappaconitine fragments / K. P. Cheremnykh, V. A. Savelev, O. P. Shkurko, E. E. Shults // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2018. – Vol. 54, No. 12. – P. 1131–1138. DOI: 10.1007/s10593-019-02404-w.
27. Shupeng, Y. Comparative metabolism of Lappaconitine in rat and human liver microsomes and in vivo of rat using ultra high-performance liquid chromatography–quadrupole/time-of-flight mass spectrometry / Y. Shupeng, Z. Huiyan, C. B. Ross [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2015. – Vol. 110. – P. 1–11. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.048.
28. Мороз, В. М. Теоретические предпосылки и поиск новых методов патогенетической терапии аритмий сердца / В. М. Мороз, Т. Н. Липницкий // Российский кардиологический журнал. – 2005. – № 6. – С. 88–90.
29. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control // World Health Organization. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564373>. (Accessed: 14.01.2024).
30. Котляров, А. А. Несколько слов об истории и перспективах развития фармакотерапии аритмий / А. А. Котляров // Российский кардиологический журнал. – 2001. – № 4. – С. 67–69.

31. Липницкий, Т. Н. Классификация антиаритмических препаратов, основанная на модулирующем влиянии их на патогенетические механизмы возникновения аритмий сердца / Т. Н. Липницкий, В. А. Козловский // Российский кардиологический журнал. – 2007. – № 6. – С. 88–90.
32. Канорский, С. Г. Современное лечение аритмий сердца: сравнение медикаментозных и немедикаментозных методов / С. Г. Канорский // Поликлиника. – 2021. – № 2. – С. 66–72. DOI: 10.29296/25877305-2020-04-05.
33. Vandewiele, F. TRPM4 inhibition by meclofenamate suppresses Ca²⁺-dependent triggered arrhythmias / F. Vandewiele, A. Pironet, G. Jacobs [et al.] // European Heart Journal. – 2022. – Vol. 43, No. 40. – P. 4195–4207. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac354.
34. Heijman, J. Molecular determinants and therapeutic potential of focal ectopic activity: more than meets the eye / J. Heijman, D. Dobrev // European Heart Journal. – 2022. – Vol. 43, No. 40. – P. 4208–4210. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac357.
35. Полиданов, М. А. Предполагаемые механизмы возникновения аритмии / М. А. Полиданов, С. Г. Алиева, О. А. Скороход, И. А. Кандаурова // Сборник статей XIV Международного научно-исследовательского конкурса «Научные достижения и открытия 2020». Пенза: Наука и Просвещение, 2020. – С. 128–133.
36. Дощицин, В. Л. Спорные вопросы лекарственной терапии аритмий сердца / В. Л. Дощицин // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2015. – № 3. – С. 147–150.
37. Бокерия, Л. А. Механизмы нарушений ритма сердца / Л. А. Бокерия, О. Л. Бокерия, Л. А. Глушко // Анналы аритмологии. – 2010. – Т. 7, № 3. – С. 69–79.
38. Зацепина, Е. Е. Аритмии: виды и причины [Электронный ресурс] / Е. Е. Зацепина // Научно-практический электронный журнал Аллея Науки. – 2022. – Т. 73, № 10. – URL: https://alley-science.ru/domains_data/files/2October2022/ARITMI%20VIDY%20I%20PRICHINY.pdf (дата обращения: 17.01.2024).

39. Паис, В. Л. Нарушения ритма сердца (аритмии) / В. Л. Паис // Безопасность труда в промышленности. – 2013. – № 8. – С. 88–93.
40. Муркамилов, И. Т. Электролитный дисбаланс и аритмии сердца при хронической болезни почек / И. Т. Муркамилов, И. С. Сабиров, В. В. Фомин [и др.] // The Scientific Heritage. – 2021. – № 60. – С. 55–70.
41. Леонова, М. В. Лекарственно-индуцированные аритмии / М. В. Леонова // Медицинский совет. – 2020. – № 21. – С. 26–40. DOI: 10.21518/2079-701X-2020-21-26-40.
42. Babapoor-Farrokhran, S. Arrhythmia in COVID-19 / S. Babapoor-Farrokhran, R. T. Rasekhi, D. Gill [et al.] // SN Comprehensive Clinical Medicine. – 2020. – No. 2. – P. 1430–1435. DOI: 10.1007/s42399-020-00454-2.
43. Kochi, A. N. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19 / A. N. Kochi, A. P. Tagliari, G. B. Forleo [et al.] // Journal of cardiovascular electrophysiology. – 2020. – Vol. 31, No. 5. – P. 1003–1008. DOI: 10.1111/jce.14479.
44. Голицын, С. П. Диагностика и лечение фибрилляции предсердий / С. П. Голицын, Е. П. Панченко, Е. С. Кропачева [и др.] // Евразийский кардиологический журнал. – 2019. – № 4. – С. 4–85.
45. Муромкина, А. В. Информированность врачей первичного звена здравоохранения о тактике ведения больных с фибрилляцией предсердий / А. В. Муромкина, О. А. Назарова, С. Е. Мясоедова, С. В. Романчук // Кардиосоматика. – 2015. – Т. 6, № 2. – С. 53–55.
46. Бокерия, Л. А. Сочетанная хирургия фибрилляции предсердий и ишемической болезни сердца / Л. А. Бокерия, О. Л. Бокерия, М. Б. Биниашвили [и др.] // Анналы аритмологии. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 26–36. DOI: 10.15275/annaritmol.2021.4.1.
47. Фролов, В. М. Дифференцированный подход к оценке желудочковой эктопической активности: показания к назначению пролонгированной формы лапаконитина гидробромида / В. М. Фролов // Врач. – 2020. – Т. 31, № 6. – С. 79–87. DOI: <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-06-16>.

48. Бова, А. А. Экстрасистолическая аритмия – подходы к ведению больных / А. А. Бова // Военная медицина. – 2019. – № 1. – С. 16–22.
49. Мрочек, А. Г. Эффективность аллапинина у больных ИБС с различными нарушениями ритма / А. Г. Мрочек, Е. Н. Губарь // Российский кардиологический журнал. – 2010. – № 5. – С. 116–120.
50. Калдыркаева, О. С. Антиаритмические свойства и токсикологическая характеристика N-(2-(2-(диалкиламино)этокси)этил)карбоксамидов / О. С. Калдыркаева, Е. В. Арзамасцев, О. А. Терехова [и др.] // Кардиологический вестник. – 2022. – Т. 17, № 2. – С. 47–54. DOI: 10.17116/Cardiobulletin20221702147.
51. Кузьмин, В. С. Ионные механизмы действия антиаритмических препаратов III класса / В. С. Кузьмин, Л. В. Розенштраух // Кардиология. – 2010. – Т. 50, № 7. – С. 62–63.
52. Соколов, С. Ф. Лаптаконитина гидробромид и его пролонгированная форма при желудочковой экстрасистолии у больных без органической патологии сердца: эффективность и безопасность / С. Ф. Соколов, М. М. Беляева, С. А. Бакалов, С. П. Голицын // Кардиология: Новости. Мнения. Обучение. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 29–37. DOI: 10.24411/2309-1908-2018-12004.
53. Халикова, М. А. Предикторы эффективности антиаритмических препаратов IC класса при пароксизмальной форме фибрилляции предсердий / М. А. Халикова, Д. А. Царегородцев, М. М. Берая, А. В. Седов // Consilium Medicum. – 2023. – Т. 25, № 10. – С. 661–667. DOI: 10.26442/20751753.2023.10.202218.
54. Потапова, К. В. Современные аспекты лечения трепетания предсердий / К. В. Потапова, В. П. Носов, Д. Ю. Королёва, Н. В. Аминева // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2020. – Т. 13, № 2. – С. 127–133. DOI: 10.17116/kardio202013021127.
55. Шубик, Ю. В. Лечение фибрилляции предсердий в России: реальная клиническая практика и рекомендации / Ю. В. Шубик, М. М. Медведев, Е. Н. Михайлов [и др.] // Вестник аритмологии. – 2021. – Т. 28, № 2. – С. 55–63. DOI: 10.35336/VA-2021-2-55-63.

56. Канорский, С. Г. Лечение фибрилляции предсердий в России: работа над ошибками / С. Г. Канорский // Вестник аритмологии. – 2021. – Т. 28, № 3. – С. e1–e4. DOI: doi.org/10.35336/VA-2021-3-e1-e4.
57. Канорский, С. Г. Лечение больных с фибрилляцией предсердий: поиск оптимальных решений / С. Г. Канорский // Кардиология. – 2016. – Т. 56, № 8. – С. 46–53. DOI: 10.18565/cardio.2016.8.46-53.
58. Канорский, С. Г. Современные возможности лечения фибрилляции предсердий / С. Г. Канорский // Врач. – 2016. – №. 9. – С. 14–20.
59. Канорский, С. Г. Фармакотерапия фибрилляции предсердий: современные возможности и перспективы / С. Г. Канорский, Ю. С. Коваленко // Врач. – 2017. – № 2. – С. 28–34.
60. Yang, S. Comparative metabolism of Lappaconitine in rat and human liver microsomes and in vivo of rat using ultra high-performance liquid chromatography–quadrupole/time-of-flight mass spectrometry / S. Yang, H. Zhang, R. C. Beier [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2015. – Vol. 110. – P. 1–11. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.048.
61. Li, X. A metabolomic study of the analgesic effect of lappaconitine hydrobromide (LAH) on inflammatory pain / X. Li, X. Wang, Z. Li [et al.] // Metabolites. – 2022. – Vol. 12, No. 10. – P. 923. DOI: 10.3390/metabo12100923.
62. Sun, M. L. Lappaconitine, a C18-diterpenoid alkaloid, exhibits antihypersensitivity in chronic pain through stimulation of spinal dynorphin A expression / M. L. Sun, J. P. Ao, Y. R. Wang [et al.] // Psychopharmacology. – 2018. – Vol. 235, No. 9. – P. 2559–2571. DOI: 10.1007/s00213-018-4948-y.
63. Li, Y. Design, synthesis, and biological evaluation of low-toxic lappaconitine derivatives as potential analgesics / Y. Li, Y. Shang, X. Li [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2022. – Vol. 243. – P. 114776. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114776.
64. Nie, J. Assessment of *in vitro* cardiotoxicity of extract fractions and diterpene alkaloids from *Aconitum leucostomum* Worosch: a short communication / J.

Nie, F. Wang, T. Ji [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2017. – Vol. 137. – P. 84–89. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.01.003.

65. Жигунова, С. Н. Запасы подземной части *Aconitum septentrionale* (*Ranunculaceae*) в сосново-березовых лесах и на вырубках Южного Урала / С. Н. Жигунова, З. А. Ибатуллина, О. И. Михайленко, Н. И. Федоров // Растительные ресурсы. – 2017. – Т. 53, № 3. – С. 357–371.

66. Средство для лечения аритмии сердца: патент РФ на изобретение № RU2513580C1 / В. В. Самородов. – Заявл. 01.02.2013. Оpubл. 20.04.2014. Бюл. № 11. – Режим доступа: <https://patentimages.storage.googleapis.com/1b/95/2c/2f1760b8754558/RU2513580C1.pdf> (дата обращения: 17.01.2024).

67. Долгинина, С. И. Место аллапинина в терапии нарушений сердечного ритма / С. И. Долгинина, Д. В. Дупляков // Кардиология: новости, мнения, обсуждения. – 2016. – № 2. – С. 25–29.

68. Sanoev, Z. I. Evaluation of anticonvulsant activity of allapinine and N-deacetylappaconitine in experimental animals / Z. I. Sanoev, T. T. Khamroev, I. T. Abdinazarov [et al.] // Journal Healthcare Treatment Development. – 2021. – Vol. 1, No. 2. – P. 12–19. DOI: 10.55529/jhtd.12.12.19.

69. Akhiyarov, A. A. Antiarrhythmic agents based on diterpenoid alkaloid lappaconitine. Protonation of N-deacethylappaconitine in methanol solutions / A. A. Akhiyarov, A. N. Lobov, S. P. Ivanov [et al.] // Russian Chemical Bulletin. – 2020. – Vol. 69. – P. 567–571.

70. Муталова, Д. К. Количественное содержание N-дезацетиллапаконитина во вторичных продуктах производства аллапинина / Д. К. Муталова, Ш. А. Отаева, Р. А. Ботиров [и др.] // Universum: химия и биология. – 2022. – Т. 97. – № 7. – С. 35–39. DOI: 10.32743/UniChem.2022.97.7.13882.

71. Chen, L. Chemical constituents in different parts of seven species of *Aconitum* based on UHPLC-Q-TOF/MS / L. Chen, C. Lai, L. Mao [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2021. – Vol. 193. – P. 113713. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113713.

72. Mi, L. A systematic review of pharmacological activities, toxicological mechanisms and pharmacokinetic studies on Aconitum alkaloids / L. Mi, Y. Li, M. Sun [et al.] // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2021. – Vol. 19, No. 7. – P. 505–520. DOI: 10.1016/S1875-5364(21)60050-X.

73. Pang, L. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation of novel lappaconitine derivatives as potential anti-inflammatory agents / L. Pang, C. Liu, G. Gong, Z. Quan // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2020. – Vol. 10, No. 4. – P. 628–645. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.09.002.

74. Sun, W. X-ray structure analysis of lappaconitine / W. Sun, Y. Wang, J. Zhang, K. Yu // Natural Product Research. – 2009. – Vol. 23, No. 10. – P. 960–962. DOI: 10.1080/14786410902975616.

75. Ma, S. Lappaconitine sulfate inhibits proliferation and induces mitochondrial-mediated apoptosis via regulating PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway in HeLa cells / S. Ma, Y. Zheng, J. Ma [et al.] // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. – 2023. – Vol. 396, No. 12. – P. 3695–3705. DOI: 10.1007/s00210-023-02564-9.

76. Wang, Y. Study of analgesic and anti-inflammatory effects of lappaconitine gelata / Y. Wang, Y. Xiao, C. Zhang, X. Sun // Journal of Traditional Chinese Medicine. – 2009. – Vol. 29, No. 2. – P. 141–145. DOI: 10.1016/s0254-6272(09)60051-0.

77. Cheremnykh, K. P. Hybrides of alkaloid lappaconitine with pyrimidine motif on the anthranilic acid moiety: Design, synthesis, and investigation of antinociceptive potency / K. P. Cheremnykh, V. A. Savelyev, S. A. Borisov [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, No. 23. – P. 5578. DOI: 10.3390/molecules25235578.

78. Heubach, J. F. Cardiac effects of lappaconitine and N-deacetylappaconitine, two diterpenoid alkaloids from plants of the Aconitum and Delphinium species / J. F. Heubach, A. Schüle // Planta medica. – 1998. – Vol. 64, No. 1. – P. 22–26.

79. Ou, S. Effect of lappaconitine on neuropathic pain mediated by P2X3 receptor in rat dorsal root ganglion / S. Ou, Y. Zhao, Z. Xiao [et al.] // Neurochemistry

international. – 2011. – Vol. 58, No. 5. – P. 564–573. DOI: 10.1016/j.neuint.2011.01.016.

80. Wright, S. N. Irreversible block of human heart (hH1) sodium channels by the plant alkaloid lappaconitine / S. N. Wright // *Molecular pharmacology*. – 2001. – Vol. 59, No. 2. – P. 183–192. DOI: 10.1124/mol.59.2.183.

81. Song, N. Lappaconitine hydrochloride inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells via mitochondrial and MAPK pathway / N. Song, J. Ma, W. Hu [et al.] // *Acta Histochemica*. – 2021. – Vol. 123, No. 5. – P. 151736. DOI: 0.1016/j.acthis.2021.151736.

82. Zhang, X. Lappaconitine sulfate inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway / X. Zhang, J. Ma, N. Song [et al.] // *Pharmacology*. – 2020. – Vol. 105, No. 11–12. – P. 705–714. DOI: 10.1159/000506081.

83. Дощицин, В. Л. Исторические аспекты применения антиаритмических препаратов в клинической практике / В. Л. Дощицин, А. И. Тарзиманова // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 350–358. DOI: 10.20996/1819-6446-2022-06-07.

84. Регистрационное удостоверение № ЛП-№(003535)-(РГ-RU) [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств. – Режим доступа: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=bdffda5c-2c43-48c9-8826-880c1ad5b314 (дата обращения: 10.12.2023).

85. Регистрационное удостоверение № ЛП-№(003130)-(РГ-RU) [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств. – Режим доступа: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=01b2db27-28ea-4529-9f0c-c16dd3b23939 (дата обращения: 10.12.2023).

86. Регистрационное удостоверение № ЛП-006669 [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств. – Режим доступа: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=b59ea764-c5f8-4e0c-b601-b506641f4b27 (дата обращения: 10.12.2023).

87. Регистрационное удостоверение № ЛП-006101 [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств. – Режим доступа: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=791a13b3-3135-47c3-88f2-513ff519b059 (дата обращения: 10.12.2023).
88. Регистрационное удостоверение № ЛП-004987 [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств. – Режим доступа: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=83fa7be2-ed3a-4001-9e67-a7600a97e55b (дата обращения: 10.12.2023).
89. Миллер, О. Н. Клинические рекомендации и мнение экспертов по применению антиаритмических препаратов в реальной практике / О. Н. Миллер, А. В. Сыров, В. Л. Дощицин [и др.] // *Consilium Medicum*. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 43–50. DOI: 10.26442/20751753.2019.5.190328.
90. Семенихина, П. А. Современные возможности радиационной защиты / П. А. Семенихина, С. А. Расова, И. В. Сопенко, Т. В. Уланова // *Актуальные научные исследования в современном мире*. – 2021. – Т. 74, № 6. – С. 94–102.
91. Осипов, А. Л. Модели классификации химических веществ / А. Л. Осипов, Д. В. Пятницев // *Новая наука: Проблемы и перспективы*. – 2016. – Т. 61, № 2–3. – С. 48–50.
92. Эрлих А. Д. Изучение доказательной базы использования лапаконитина гидробромида у пациентов с фибрилляцией предсердий / А. Д. Эрлих // *Кардиология*. – 2016. – Т. 56, № 3. – С. 48–53. DOI: 10.18565/cardio.2016.3.48-53.
93. Fan, C. Quantification of lappaconitine in mouse blood by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study / C. Fan, S. Xiuwei, H. Peng [et al.] // *BioMed research international*. – 2019. – URL: <https://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2019/6262105.pdf> (Accessed: 17.01.2024).
94. Yingzi, W. Quantitative determination of lappaconitine in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in the pharmacokinetic study in rabbits / W. Yingzi, H. Chunchao, H. Kuibang, F. Ailing // *African Journal of*

Pharmacy and Pharmacology. – 2013. – Vol. 12, No. 7. – P. 650–657. DOI: 10.5897/AJPP12.1301.

95. Fan, B. Simultaneous determination of six alkaloids in rat plasma by SPE-HPLC–MS/MS and their pharmacokinetics after oral administration of radix aconiti preparata extract / B. Fan, S. Xu, J. Bi [et al.] // ACS Pharmacology & Translational Science. – 2020. – Vol. 4, No. 1. – P. 118–127. DOI: 10.1021/acspsci.0c00133.

96. Родионов, Г. Г. ВЭЖХ-МС/МС методика количественного определения силденафила и его метаболита в плазме крови человека / Г. Г. Родионов, И. И. Шантырь, И. Э. Ушал [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 192–200. DOI: 10.30895/1991-2919-2020-10-3-192-200.

97. Аль-Дурайби, А. М. Разработка и валидация определения элтромбопага в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС / А. М. Аль-Дурайби, А. Л. Куликов, М. В. Покровский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 4. – С. 226–239. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-226-239.

98. Баймеева, Н. В. Количественное определение содержания арипипразола, рисперидона и их активных метаболитов в плазме крови человека посредством жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС) / Г. В. Баймеева, Е. В. Бондаренко, С. С. Потанин, И. И. Мирошниченко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 3. – С. 170–175.

99. Подпружников, Ю. В. Исследование биоэквивалентности рилузола с использованием УЭЖХ-МС/МС метода / Ю. В. Подпружников, В. Е. Сабко, В. В. Юрченко [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С. 56–64.

100. Долов, М. С. Разработка метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для определения ривастигмина в плазме крови человека в клинических исследованиях сравнительной фармакокинетики / М. С. Долов, Л. А. Фишгойт, П.

Д. Соболев, Е. П. Ткач // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. – Т. 67, № 11–12. – С. 22–28. DOI: 10.37489/0235-2990-2022-67-11-12-22-28.

101. Lappaconitine. Chemical and Physical Properties // PubChem. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441743#section=Chemical-and-Physical-Properties> (Accessed: 01.12.2023).

102. N-deacetyl-lappaconitine. Chemical and Physical Properties // PubChem. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44566467#section=Chemical-and-Physical-Properties> (Accessed: 01.12.2023).

103. Trimebutine. Chemical and Physical Properties // PubChem. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimebutine#section=Chemical-and-Physical-Properties> (Accessed: 01.12.2023).

104. Погодаева, Н. Н. Константы протеинизации дитерпеновых алкалоидов / Н. Н. Погодаева, Ц. Жапова, А. А. Семенов // Журнал физической химии. – 2002. – Т. 76, № 4. – С. 664–666.

105. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456026107> (дата обращения: 04.09.2023).

106. Weijian, Y. Quantification and pharmacokinetics of alpinetin in rat plasma by UHPLC–MS/MS using protein precipitation coupled with dilution approach to eliminate matrix effects / Y. Weijian, L. Xiaoji, Z. Youting, X. Youxiao // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 152, No. 15. – P. 242–247. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.046.

107. Macek, J. Rapid determination of valsartan in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography / J. Macek, J. Klíma, P. Ptáček // Journal of Chromatography B. – Vol. 832, No. 17. – P. 169–172. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.12.035.

108. Mubarak, M. A. El. Development and validation of simple step protein precipitation UHPLC-MS/MS methods for quantitation of temozolomide in cancer patient plasma samples / M. A. El Mubarak, E. K. Stylos, M. V. Chatziathanasiadou [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – Vol. 162, No. 5, – P. 164–170. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.09.019.

109. Lüthi, G. Buprenorphine and norbuprenorphine quantification in human plasma by simple protein precipitation and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry / G. Lüthi, V. Blangy, C. B. Eap, N. Ansermot // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2013. – Vol. 77. – P. 1–8. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.12.023.

110. Арчакова, О. А. Особенности разработки методики определения лаптаконитина 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.

111. Арчакова, О. А. Биоаналитические аспекты изучения лекарственных средств с неустановленной фармакокинетикой и метаболизмом на примере препаратов лаптаконитина / 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.

112. Bioanalytical method validation. Guidance for Industry // U.S. Food and Drug Administration. – 2018. – URL: <https://www.fda.gov/media/70858/download> (Accessed: 04.09.2023).

113. Guideline on bioanalytical method validation // European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – 2012. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (Accessed: 04.09.2023).

114. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. – М.: Гриф и К, 2013. – 328 с.

115. Арчакова, О. А. Особенности проведения биоаналитических исследований препаратов лаптаконитина гидробромида / О. А. Арчакова, Т. Н. Комаров, Д. С. Щелгачева [и др.] // 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.

116. 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.

117. Арчакова, О. А. Определение лаптаконитина, дитерпенового алкалоида, получаемого из растений *Aconitum leucostomum*, и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека и в цельной крови человека / О. А. Арчакова, Т. Н. Комаров, А. В. Рогов [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 105–113.

118. Merone, G. M. Analytical chemistry in the 21st century: Challenges, solutions, and future perspectives of complex matrices quantitative analyses in biological/clinical field / G. M. Merone, A. Tartaglia, M. Locatelli [et al.] // Analytica. – 2020. – Vol. 1, No. 1. – P. 44–59.

119. Fu, Y. Critical considerations of matrix selection in LC–MS bioanalysis for toxicokinetic and pharmacokinetic assessment in drug development / Y. Fu, W. Li, J. Flarakos // Bioanalysis. – 2021. – Vol. 13, No. 8. – P. 605–608. DOI: 10.4155/bio-2020-0319.

120. Medvedovici A., Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques / A. Medvedovici, E. Bacalum, V. David // *Biomedical Chromatography*. – 2018. – Vol. 32, No. 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29143970/> (Accessed: 17.01.2024).

121. Арчакова, О. А. Изучение фармакокинетики пролонгированного антиаритмического препарата лапаконитина гидробромида (Аллафорте®, АО «Фармцентр Вилар», Россия) / О. А. Арчакова, Н. С. Багаева, Т. Н. Комаров [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 140–147.

122. Соколов, С. Ф. Результаты клинического изучения препарата аллапинин и современные подходы к лечению больных с нарушениями ритма сердца / С. Ф. Соколов // *Вестник аритмологии*. – 2011. – № 64. – С. 60–70.

123. Li, M. Simultaneous determination of aconitine, mesaconitine, hyraconitine, bulleyaconitine and lappaconitine in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry / M. Li, Z. Cai // *Analytical Methods*. – 2013. – Vol. 5, No. 16. – P. 4034–4038.

124. Соколов, А. В. Оптимизация фармакотерапии на основе терапевтического лекарственного мониторинга / А. В. Соколов, И. Ф. Тищенко, Ю. Б. Белоусов // *Лечебное дело*. – 2004. – № 3. – С. 34–39.

125. Doki, K. Optimal sampling time and clinical implication of the SCN5A promoter haplotype in propafenone therapeutic drug monitoring / K. Doki, Y. Shirayama, Y. Sekiguchi [et al.] // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2018. – Vol. 74, No. 10. – P. 1273–1279. DOI: 10.1007/s00228-018-2541-2.

126. Rahman M. Rapid quantitation of flecainide in human plasma for therapeutic drug monitoring using liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry / M. Rahman, L. Couchman, V. Povstyan [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring*. – 2019. – Vol. 41, No. 3. – P. 391–395. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000586.

ПРИЛОЖЕНИЕ

**АКТЫ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ В
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ РАБОТУ**



Общество с ограниченной ответственностью
«ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»

Юр./факт. адрес: 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д.8, пом.1/1.
ИНН 9701010444, КПП 772701001, ОГРН 1157746853780, ОКПО 49285758,
Р/с 40702810838000271503 в ПАО СБЕРБАНК г. Москва, к/с 3010181040000000225,
Тел. +7 (499) 281-81-11 website: cpha.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ЦФА»
Д. фарм. н., Шохин И. Е.



» 2023

Акт внедрения

Предмет внедрения: биоаналитическая методика определения лаптаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаптаконитина в плазме крови человека, применяемая для проведения фармакокинетических исследований препаратов лаптаконитина, результаты проведения исследований фармакокинетики препаратов лаптаконитина

Кем предложен: соискателем учёной степени кандидата фармацевтических наук Арчаковой Ольгой Александровной, заведующей лабораторией биоаналитических исследований ИЦ ООО «ЦФА»

Кем и где выдан: исследовательский центр ООО «ЦФА»

Цель внедрения: проведение исследований фармакокинетики препаратов лаптаконитина с целью приведения регистрационного досье в соответствие

Результат внедрения: предложенные методологические основы и подходы внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «ЦФА»

Директор исследовательского центра, к. фарм. н.



Комаров Т.Н.



АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«Фармцентр ВИЛАР»

Юр. адрес: 123458, г.Москва, ул.Маршала Прошлякова д.30, эт.2, оф.206 Факт. адрес: 117216, г.Москва, ул. Грина, д.7

тел. (499) 519-30-88
факс (495) 388-33-09
www.vilar-plant.ru
5193088@mail.ru

от 01.09.2023 исх.№ 8/н

Акт внедрения

Предмет внедрения: биоаналитическая методика определения лаптаконитина и его метаболита в плазме крови человека, результаты исследования фармакокинетики препаратов лаптаконитина

Кем предложен: соискателем учёной степени кандидата фармацевтических наук Арчаковой Ольгой Александровной

Кем и где выдан: АО «Фармцентр ВИЛАР», г. Москва

Цель внедрения: изучение фармакокинетики с целью внесения изменений в регистрационное досье

Результат внедрения: результаты исследования фармакокинетики препаратов лаптаконитина внесены в регистрационное досье.

Заместитель генерального директора

АО «Фармцентр ВИЛАР», к.б.н.



А.В. Рогов

УТВЕРЖДАЮ

первый проректор ЮКМА,
 профессор М.М. Есиркепов
 «22» 2023г.

Протокол № 7 от 14.12.2023 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ №

Предмет внедрения: методика определения лаппаконитина и его активного метаболита в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, исследования фармакокинетики препаратов лаппаконитина гидробромида, полученного из алкалоидов аконита белоустного (*Aconitum leucostomum*) и аконита северного (*Aconitum septentrionale*).

Авторы внедрения: Арчакова Ольга Александровна, соискатель учёной степени кандидата фармацевтических наук, заведующая лабораторией биоаналитических исследований ООО «Центр фармацевтической аналитики», г. Москва, РФ.

Где внедрено: кафедра фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии, г. Шымкент, РК.

Цель внедрения: теоретическое обоснование и практическое применение методики ВЭЖХ-МС/МС для проведения исследований фармакокинетики лекарственных средств из группы алкалоидов.

Результаты внедрения: предложенные методики определения лаппаконитина и его активного метаболита в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС внедрены в образовательный процесс по токсикологической химии по разделу «Группа веществ, изолируемых из биоматериалов методом экстракции», а также результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность кафедры фармацевтической и токсикологической химии ЮКМА.

Заведующая кафедрой фармацевтической и
 токсикологической химии ЮКМА,
 д.фарм.н., профессор

 С.К. Ордаева

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России
д.фарм.н., профессор



И. А. Наркевич

« 7 » 2024 г.




**Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в научно-исследовательский процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук, профессора	Е. В. Флисюк
и членов комиссии	научного сотрудника деpartамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. фармацевт. наук директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук, доцента	К. О. Сидорова И. А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Арчаковой Ольги Александровны на тему «Разработка аналитических подходов к проведению исследований фармакокинетики препаратов лапаконитина», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Аналитические подходы к проведению исследований фармакокинетики препаратов лапаконитина», использовано в научно-исследовательской деятельности ИЛ ЦККЛС ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Председатель	проректор по научной работе, д-р. фармацевт. наук, профессор		Е. В. Флисюк
члены комиссии	научный сотрудник деpartамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. фармацевт. наук директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук, доцент	 	К. О. Сидоров И. А. Титович