

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

*На правах рукописи*

Яичков Илья Игоревич

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

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

Ярославль, 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| <b>Введение</b> .....  | 5  |
| <b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....   | 13 |
| 1.1. Общая характеристика изучаемых лекарственных препаратов и особенности их биоаналитической методологии.....  | 14 |
| 1.1.1. Общая характеристика метилдопы и методики её количественного определения в биологических жидкостях.....   | 15 |
| 1.1.2. Общая характеристика мебеверина и особенности фармакокинетических исследований его препаратов.....  | 17 |
| 1.1.3. Общая характеристика препаратов микофеноловой кислоты и особенности определения микофеноловой кислоты и её метаболитов в биологических жидкостях..... | 20 |
| 1.2. Способы стабилизации биологических проб при проведении биоаналитических исследований.....   | 28 |
| 1.3. Характеристика изучаемых классов потенциально нестабильных соединений   | 31 |
| 1.3.1. Химические свойства фенольных соединений и причины их возможной нестабильности.....   | 31 |
| 1.3.2. Факторы, влияющие на стабильность глюкуронидов лекарственных веществ в биологических жидкостях.....   | 32 |
| Выводы по главе.....   | 34 |
| <b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....   | 35 |
| 2.1. Дизайн исследования.....  | 35 |
| 2.2. Используемое оборудование, стандартные образцы и реактивы.....  | 37 |
| 2.3. Приготовление калибровочных образцов и образцов контроля качества для проведения биоаналитических исследований.....                                     | 39 |
| 2.4. Порядок валидации разработанных методик.....  | 42 |
| 2.5. Дизайн фармакокинетических исследований.....  | 45 |
| 2.5.1. Дизайн исследования биоэквивалентности микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой.....  | 47 |
| 2.5.2. Дизайн исследования биоэквивалентности метилдопы в форме таблеток.....  | 49 |
| 2.5.3. Дизайн исследования фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением.....  | 51 |
| <b>Глава 3. Разработка методик количественного определения микофеноловой кислоты, метилдопы и метаболитов мебеверина в плазме крови</b> .....                | 53 |
| 3.1. Разработка методик количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови.....  | 53 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.1.1.   | Разработка методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.....   | 54 |
| 3.1.1.1. | <i>Предварительное изучение стабильности микофеноловой кислоты в плазме крови.....</i>   | 58 |
| 3.1.1.2. | <i>Изучение обратной конверсии фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты в процессе хранения образцов плазмы.....</i>   | 59 |
| 3.1.1.3. | <i>Валидация ВЭЖХ-МС/МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме .....</i>  | 60 |
| 3.1.2.   | Разработка методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ВЭЖХ-МС.....  | 63 |
| 3.1.2.1. | <i>Исследование обратной конверсии глюкуронидов микофеноловой кислоты в процессе хранения при значении НПКО методики 0,05 мкг/мл...</i>                            | 66 |
| 3.1.2.2. | <i>Валидация ВЭЖХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме .....</i>   | 68 |
| 3.1.3.   | Разработка методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ГХ-МС.....  | 70 |
| 3.1.3.1. | <i>Изучение зависимости степени извлечения микофеноловой кислоты из водных растворов от рН среды, природы органического растворителя и времени экстракции.....</i> | 74 |
| 3.1.3.2. | <i>Подбор условий экстракции микофеноловой кислоты из плазмы .....</i>   | 75 |
| 3.1.3.3. | <i>Валидация ГХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме.....</i>  | 77 |
| 3.1.4.   | Перекры́стная валидация разработанных методик определения микофеноловой кислоты в плазме крови.....  | 79 |
| 3.2.     | Разработка методики количественного определения метилдопы в плазме крови.....  | 81 |
| 3.2.1.   | Предварительное изучение краткосрочной стабильности метилдопы в плазме и подбор стабилизатора для предотвращения её окисления .....                                | 85 |
| 3.2.2.   | Валидация методики определения метилдопы в плазме методом ВЭЖХ-МС/МС.....  | 88 |
| 3.3.     | Разработка методики количественного определения мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови.....  | 91 |
| 3.3.1.   | Предварительное изучение стабильности деметилированной мебевериновой кислоты в плазме и обратной конверсии её фенольного глюкуронида .....                         | 95 |
| 3.3.2.   | Валидация ВЭЖХ-МС/МС-методики определения мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме.....  | 97 |
| 3.4.     | Подходы к разработке методик количественного определению веществ,  |    |

|   |            |
|---|------------|
| содержащих в структуре фенольные гидроксилы и образующих в процессе метаболизма глюкурониды, в плазме.....                              | 101        |
| Выводы по главе.....  | 107        |
| <b>Глава 4. Результаты фармакокинетических исследований.....</b>  | <b>109</b> |
| 4.1. Результаты исследования биоэквивалентности микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой, с применением ВЭЖХ-МС/МС..... | 109        |
| 4.2. Результаты исследования биоэквивалентности метилдопы в форме таблеток с применением ВЭЖХ-МС/МС.....                                | 117        |
| 4.3. Результаты исследования фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением с применением ВЭЖХ-МС/МС.....  | 123        |
| Выводы по главе.....  | 128        |
| Обсуждение.....   | 130        |
| Общие выводы.....   | 137        |
| Практические рекомендации.....  | 139        |
| Список сокращений.....  | 140        |
| Список литературы.....  | 142        |
| Приложение 1.....   | 162        |
| Приложение 2.....   | 164        |
| Приложение 3.....   | 167        |
| Приложение 4.....   | 168        |
| Приложение 5.....   | 172        |
| Приложение 6.....   | 176        |
| Приложение 7.....   | 179        |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Фармакокинетические (ФК) исследования проводятся в рамках доклинических и первой фазы клинических испытаний (КИ) оригинального лекарственного препарата (ЛП) [26], подтверждения биоэквивалентности (БЭ) воспроизведённого ЛП [45, 48, 145, 151, 166], а также после регистрации ЛП для оценки влияния различных факторов (например, совместного применения нескольких ЛП) на его фармакокинетические параметры [26, 70, 74, 123]. Наиболее востребованным видом данных исследований является изучение БЭ. За 2014 г. Министерством здравоохранения РФ было выдано 264 разрешения на проведение исследований БЭ, в 2015 г. количество разрешений увеличилось до 296 [11], а в 2016 - достигло 316 [12]. В 2017 г. число выданных разрешений упало до 222, однако доля испытаний БЭ среди всех видов КИ в период с 2014 по 2017 г. оставалась относительно стабильной - от 35,20 - 36,81% [11, 12].

Для расчёта основных фармакокинетических параметров лекарственного препарата в рамках КИ необходимо количественное определение лекарственных веществ (ЛВ), а в некоторых случаях, их метаболитов, в биологических жидкостях, среди которых предпочтение отдаётся плазме крови. Одной из наиболее сложных задач фармакокинетических исследований является измерение концентрации веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы. Данные соединения способны разрушаться на различных этапах исследования, таких как отбор крови, хранение образцов, замораживание и размораживание образцов, выполнение анализов [26, 32, 39, 40, 42, 43, 118]. Этой проблеме посвящён ряд обзоров, в которых приведены примеры веществ и меры, предпринятые для предупреждения их разложения [58, 71, 93, 118]. Однако, в этих публикациях отсутствует подробное описание процесса разработки методики и последовательности действий при подборе условий замедления деградации данных соединений.

Наиболее частыми причинами нестабильности молекул в биологических объектах являются окисление и гидролиз [26, 39, 40, 42, 43, 58, 71, 93, 107, 108, 118]. В качестве примеров легкоокисляющихся в плазме соединений для выполнения исследования выбраны вещества, содержащие в своей структуре фенольные гидроксилы [58, 71]. Обратная конверсия глюкуронидов лекарственных веществ в исходные соединения в процессе хранения образцов и выполнения анализов является наиболее распространённым

примером гидролиза соединений в биологических жидкостях [26, 40, 71, 93, 107, 108, 118]. Только за период с 2013 по 2018 г опубликованы результаты более 30 биоаналитических исследований ЛС, действующие вещества метаболизируются путём глюкуроновой конъюгации [5, 26, 34 - 36, 53, 57, 61, 68, 89, 91, 93, 106 - 108, 110, 111, 118, 123, 131, 140, 144, 149, 153, 154, 158, 165, 171, 174, 182, 183, 184, 187]. Кроме того, изучение обратной конверсии этой группы метаболитов, наряду N-оксидами, сложными эфирами и лактонами, является обязательной частью валидации биоаналитической методики [22, 24, 85, 87]. Поэтому разработка подходов к проведению данного испытания является актуальной.

Для проведения исследования были выбраны микофеноловая (МФК) и деметилированная мебевериновая кислота (ДМК), которые содержат один фенольный гидроксил, и метилдопа, которая содержит два фенольных гидроксильных. При этом МФК метаболизируется с образованием O-ацилглюкуронида (АГМФК) и фенольного глюкуронида (ФГМФК), а ДМК – фенольного глюкуронида (ФГДМК) [114, 123, 137, 157, 177].

Лекарственные препараты микофеноловой кислоты, микофенолат натрия и микофенолата мофетил, обладают высоковариабельной фармакокинетикой, которая обусловлена энтерогепатической рециркуляцией фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты [45, 48, 111, 145, 165]. Они используются при трансплантации органов, в основном, почек, что предъявляет повышенные требования методологии исследований биоэквивалентности дженериков данных препаратов. Ошибка, связанная с неправильным количественным определением данного аналита в биологических жидкостях, может привести к выпуску неэффективного и небезопасного лекарственного препарата.

Деметилированная мебевериновая кислота является основным метаболитом мебеверина (МБ), миотропного спазмолитика, используемого, в основном, при спазмах гладкой мускулатуры ЖКТ [131, 162, 179]. Несмотря на то, что данный препарат начал использоваться с 1965 г., единый подход к изучению фармакокинетики МБ отсутствует.

На настоящий момент в ГРЛС не зарегистрировано ни одного воспроизведённого препарата метилдопы отечественного производства [19]. Исследований БЭ таблеток метилдопы также ранее не проводились на территории Российской Федерации [26, 40, 49, 151, 166].

Следует отметить, что данные представители ЛВ и их метаболитов были выбраны из множества примеров потенциально нестабильных соединений, т.к. все методики раз-

работывались для проведения заранее запланированных исследований биоэквивалентности и фармакокинетики их лекарственных препаратов.

### **Степень разработанности темы**

На настоящем момент известны результаты 5 исследований БЭ препаратов микофенолата мофетила [45, 48, 145, 165, 186]. Изучение БЭ таблеток микофенолата натрия ранее проводилось. В литературе опубликовано множество методик количественного определения микофеноловой и её конъюгатов с применением капиллярного электрофореза [62, 136, 137], ВЭЖХ с спектрофотометрическим [48, 65, 67, 74, 75, 143, 149, 157, 186], флюориметрическим [94, 155, 188], tandemным масс-спектрометрическим [45, 50, 51, 53, 56, 60, 70, 92, 115, 116, 123, 126, 145, 165, 177, 178] детектированием и иммунохимических методов анализа [54, 55, 140, 148, 170]. В ряде работ авторы используют буферные растворы, а также растворы кислот для предотвращения обратной конверсии её фенольного глюкуронида и ацилглюкуронида [50, 56, 65, 128, 137, 156]. В других публикациях указано, что гидролиз данных метаболитов является не значительным, и добавление стабилизаторов не требуется [92, 118]. Однако, в большинстве исследований изучение данного явления не проводилось [45, 62, 65, 67, 74, 94, 123, 136, 165, 178, 188]. Поэтому изучение обратной конверсии ФГМФК и АГМФК, а также разработка новых экспрессных и точных методик, в том числе с применением методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС, которые не были использованы ранее для определения МФК, являются актуальным.

При оценке сравнительной фармакокинетики капсул и таблеток мебеверина рассчитывались ФК параметры ДМК [179], при изучении ФК таблеток мебеверина определяли концентрации в плазме мебевериновой кислоты (МК) и мебеверинового спирта (МС) [160], а также ДМК, ДМК и МС [131]. Таким образом, подходы к проведению их фармакокинетических исследований МБ отличаются [131, 160, 179]. Общими недостатками методик количественного определения ДМК и других метаболитов мебеверина в плазме и сыворотке крови методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС [77, 105, 131, 160] являются длительная и трудоёмкая процедура подготовки проб с применением твёрдофазной (ТФЭ) и жидкостно-жидкостной (ЖЖЭ) экстракции и низкая чувствительность. Стабильность фенольного глюкуронида ДМК в плазме в процессе хранения также не была изучена.

В зарубежной литературе опубликованы результаты 4 исследований БЭ метилдопы [49, 138, 151, 166]. Недостатками биоаналитических методик определения метилдопы в плазме крови с применением ВЭЖХ с флюориметрическим [49, 138] и тандемным масс-спектрометрическим [166, 151] детектированием, использованных при выполнении данных работ, также являются длительная пробоподготовка с применением жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции [49, 138, 166] и низкая чувствительность [151].

В отечественной и зарубежной литературе опубликованы статьи, посвященные биоаналитическим и фармакокинетическим исследованиям веществ, имеющих в структуре фенольные гидроксилы и образующих глюкуроновые конъюгаты, как с применением растворов стабилизаторов, так и без их использования [45, 48, 50, 51, 53, 54- 58, 60- 62, 65 - 68, 70, 71, 74, 75, 92, 94, 115, 116, 123, 126, 136, 137, 140, 143, 145, 148, 149, 155, 157, 165, 170, 177, 178, 186, 188]. Однако в данных источниках, а также ряде обзоров [58, 71, 93, 118] не приведены подходы к разработке методик количественного определения в биологических жидкостях соединений, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы и образующих нестабильные метаболиты. Анализ публикаций, посвящённых фармакокинетическим и биоаналитическим исследованиям метилдопы, микофеноловой и деметилированной мебевериновой кислот показал, что добавление растворов антиоксидантов к образцам биологических жидкостей не требуется. Однако, в связи с указанными выше особенностями структуры данных веществ и наличием у МФК и ДМК потенциально нестабильных метаболитов существует риск получения ложных результатов из-за разложения данных соединений в биологических жидкостях.

**Цель исследования:**

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

**Задачи исследования:**

1. Провести изучение стабильности микофеноловой кислоты, деметилированной мебевериновой кислоты и метилдопы в плазме крови и, при необходимости, осуществить подбор стабилизатора.



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

### **Научная новизна**

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

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

Впервые рассчитаны фармакокинетические параметры мебевериновой кислоты после приёма мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением в дози-

ровке 200 мг. Установлена корреляция между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови. Впервые при ВЭЖХ-МС/МС-определении мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови использован метод осаждения белков без концентрирования для пробоподготовки. При этом доказано отсутствие обратной конверсии фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты как в процессе хранения образцов, так и в процессе масс-спектрометрического детектирования.

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

### **Теоретическая и практическая значимость темы**

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

Методики определения микофеноловой кислоты, метилдопы и метаболитов мебеверина в плазме внедрены в практическую деятельность биоаналитических лабораторий ООО «Квинта-аналитика Ярославль» и Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского» для проведения фармакокинетических исследований (прил. 7). Методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме также внедрены в практическую деятельность химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационное исследование включало в себя два экспериментальных этапа. На первом этапе была выполнена разработка и валидация биоаналитических методик для определения изучаемых соединений, а также перекрёстная валидация методик определения микофеноловой кислоты на образцах плазмы, полученных от крыс. Второй этап заключался в проведении исследований биоэквивалентности таблеток микофеноловой

кислоты и метилдопы и фармакокинетики капсул мебеверина на здоровых добровольцах.

### **Личный вклад автора**

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

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

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

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

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

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

1. При проведении биоаналитических исследований микофеноловой кислоты в качестве антикоагулянта следует использовать  $K_3ЭДТА$  с целью минимизации гидролиза её глюкуроноидов в плазме.
2. Для предотвращения разложения метилдопы в качестве антикоагулянта необходимо применять  $K_3ЭДТА$ , а также добавлять к плазме раствор стабилизатора, содержащий смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в concentra-

циях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, из расчёта 0,2 мл раствора стабилизатора на 1 мл плазмы крови.

3. Результаты проведённых исследований сравнительной фармакокинетики свидетельствуют о биоэквивалентности тестируемого препарата метилдопы референтному препарату «Допегит» и отсутствии биоэквивалентности тестируемого препарата микофенолата натрия и референтного препарата «Майфортик».
4. Между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислоты в промежутке от 0,5 ч до 8 ч после приёма препарата «Дюспаталин» в форме капсул с пролонгированным высвобождением присутствует достоверная положительная корреляция.

### **Объём и структура диссертации**

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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Применительно к изучению лекарственных препаратов основным видом биоаналитических исследований (БИ) являются фармакокинетические исследования. На этапе доклинических исследований осуществляется изучение фармакокинетики субстанции нового лекарственного препарата при различных путях введения, распределение ЛВ по органам и тканям, его метаболизм и экскреция, а также выбор и оптимизация состава лекарственной формы на основании определения относительной биодоступности. В ходе I фазы клинических испытаний осуществляют расчёт основных фармакокинетических констант ЛП на людях при его однократном и последующем многократном приёме [26]. При исследованиях биоэквивалентности сравниваются такие фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов, как максимальная концентрация в плазме крови ( $C_{\max}$ ), и площадь под фармакокинетической кривой «концентрация время» ( $AUC_{0-t}$ ) и средняя скорость всасывания ( $C_{\max}/AUC_{0-t}$ ) [22, 23, 32, 86, 88]. Данный вид БИ является основным способом контроля качества и оценки взаимозаменяемости воспроизведённых лекарственных средств [1, 3].

В современной клинической практике для индивидуального подбора дозировки, а также интервалов между приёмами ЛП совместно с генетическим фенотипированием применяется терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) [33, 38]. ТЛМ – метод контроля и рационализации проводимой фармакотерапии, основанный на определении концентрации ЛВ, а также их метаболитов, в биологических жидкостях или, иногда, и в тканях. Его применяют при лечении ЛП с узким терапевтическим диапазоном, высоко-вариабельной фармакокинетикой, при одновременном назначении нескольких ЛП, при неэффективности фармакотерапии, а также проявлении токсических эффектов ЛП, связанных с передозировкой [150]. ТЛМ чаще всего используется при терапии химиотерапевтическими [84, 139], гипотензивными [172], антиаритмическими, гипохолестеринэтическими [118, 150], антинеопластическими [61], нейролептическими [72], иммуносупрессивными [68, 187] и противосудорожными средствами [129].

Основными методами анализа, используемыми для определения концентрации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических средах, являются иммунохимические, электрохимические, хроматографические и хромато-масс-спектрометрические [26, 40].

Среди иммунохимических методов для изучения фармакокинетики, биоэквивалентности и терапевтического лекарственного мониторинга наиболее часто применяются радиоиммунный и иммуноферментный анализ. Они имеют достаточную для данных целей чувствительность, но не обладают абсолютной специфичностью к низкомолекулярным веществам. В результате перекрёстная реакция с его близкими по строению метаболитами и другими эндогенными веществами может привести к получению неточных результатов. Кроме того, для проведения анализа требуется синтез специфических антител. В настоящее время основной точкой приложения иммунохимических методов является исследования фармакокинетики макромолекул [26, 64]. Так, при определении биоаналогов инсулина в плазме используют радиоиммунный, хемилюминисцентный и гетерогенный иммуноферментный анализ [175], при определении биосимиляров эритропоэтина - гетерогенный иммуноферментный анализ [181].

Для проведения биоаналитических исследований низкомолекулярных лекарственных препаратов предпочтение отдаётся более селективным инструментальным методам анализа, таким как жидкостная и газовая хроматография [3, 5, 8-10, 18, 25- 29, 31, 40, 118]. В настоящее время для детектирования, как правило, применяют tandemные масс-спектрометрические детекторы [8-10]. Однако, известны случаи использования спектрофотометрических [28, 29, 31] и флюориметрических детекторов [27]. Так, определение производного бензимидазола РУ-1205 в биологических объектах проводилось с помощью ВЭЖХ-УФ [29], а изучение биодоступности производного глутаминовой кислоты – глутарона - с помощью ВЭЖХ-ФД [27].

### **1.1. Общая характеристика изучаемых лекарственных препаратов и особенности их фармакокинетической и биоаналитической методологии**

Для проведения исследования в качестве примера были выбраны примеры соединений, которые потенциально могут быть подвержены процессам окисления и гидролиза в биологических жидкостях. Наиболее частыми примерами легкоокисляющихся соединений являются ЛП, содержащие в своей структуре фенольные гидроксилы [26, 40, 71, 93, 107, 108, 118]. Глюкурониды лекарственных веществ использовались в качестве примера легкогидролизующихся соединений, т.к. путём глюкуроновой конъюгации метаболизируется большинство молекул ксенобиотиков, содержащих в структуре гидроксильные и карбоксильные группы [118].

Метилдопа, содержащая два фенольных гидроксила, является потенциально наиболее реакционноспособной, т.к. большинство примеров легкоокисляющихся в биологических жидкостях молекул относятся к двуатомными фенолами [71, 103, 107, 108, 118, 134, 168]. У молекулы деметилированной мебеверинового кислоты, в отличие от микофеноловой кислоты, в бензольном кольце отсутствуют какие либо электронодонорные и электроноакцепторные заместители, за исключением алифатической углеводородной цепи и одного фенольного гидроксила, которые могут вступать в сопряжение с бензольным кольцом и дополнительно повлиять на стабильность молекулы. Это необходимо для установления особенностей структуры фенольных соединений, влияющих на их стабильность к окислению в биологических объектах. Деметилированная мебевериновая кислота метаболизируется с образованием фенольного глюкуронида (ФГДМК). Продуктами конъюгации молекулы микофеноловой кислоты являются О-ацилглюкуронид (АГМФК) и фенольного глюкуронид (ФГМФК) [66, 107, 108], а ДМК – [114]. Эти классы глюкуроновых конъюгатов являются самыми распространёнными [107, 108, 118].

### ***1.1.1. Общая характеристика метилдопы и методики её количественного определения в биологических жидкостях***

Метилдопа является антигипертензивным препаратом центрального действия (рис. 1.1). Его активный метаболит,  $\alpha$ -метилнорадреналин, образуется после прохождения лекарственного вещества через гематоэнцефалический барьер. Он является агонистом центральных пресинаптических  $\alpha_2$ -адренорецепторов, активация которых приводит к подавлению выделения норадреналина в синаптическую щель симпатических нервных окончаний. Это приводит к снижению тонуса симпатической нервной системы и, как следствие, снижению артериального давления [166, 172]. МД выпускается в форме таблеток в дозировке 250 мг [17, 19].

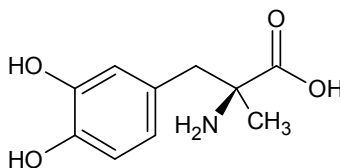


Рисунок 1.1. Структурная формула метилдопы (3-(3,4-Диоксифенил)-2-метилаланина)

Согласно отечественным клиническим рекомендациям «Диагностика и лечение артериальной гипертензии у беременных» [13] и ряду зарубежных клинических рекомендаций [59, 97, 124, 163] метилдопа относится к первой линии лекарственных

средств для лечения гипертонии у беременных, так как в ходе длительного клинического применения была показана его безопасность для матери, плода и новорожденного. Данный лекарственный препарат принадлежит к категории В Классификации лекарственных препаратов по степени риска для плода FDA [13].

Таблица 1.1

## Фармакокинетические параметры метилдопы после приёма таблеток

| Дозировка, мг |            | Фармакокинетические параметры |                |                       |                            | Источник |
|---------------|------------|-------------------------------|----------------|-----------------------|----------------------------|----------|
|               |            | $C_{\max}$ , нг/мл            | $T_{\max}$ , ч | $AUC_{0-t}$ , нг·ч/мл | $AUC_{0-\infty}$ , нг·ч/мл |          |
| 250           | «Допегит»  | 1527,2±713,6                  | 3,15±1,17      | 6538,7±2517,2         | 6560,0±2617,2              | [151]    |
|               | «Презинол» | 1477,4±720,6                  | 2,80±0,97      | 6080,6±2503,0         | 6275,1±2509,6              |          |
| 250           |            | 771,3 ± 412,7                 | 2,25 ± 0,72    | 4301,2±2201,4         | 5352,9±2129,2              | [166]    |
| 500           |            | 1362±804                      | 2,9±1,1        | 5320±2888             | 5479±2921                  | [49]     |
| 500           |            | 1358 ± 621                    | 3,0            | 6862±3643             | 6862±3643                  | [138]    |

В литературе опубликованы результаты трёх открытых рандомизированных перекрёстных исследований биоэквивалентности таблеток метилдопы с однократным приёмом [138, 151, 166]. По результатам данных исследований тестируемые препараты были признаны биоэквивалентными. В статье G. Bahrami с соавторами [49] приводятся только фармакокинетические параметры только референтного препарата в дозировке 500 мг. Большинство работ были выполнены на 24 здоровых добровольцах [49, 138, 151], за исключением работы H. Valizadeh с соавторами [166].

Значения основных фармакокинетических параметров  $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$  метилдопы после приёма таблеток в дозировке 250 мг, полученные в ходе сходных по дизайну исследований биоэквивалентности, отличаются приблизительно в 2 раза [151, 166]. При этом величина максимальной концентрации данного вещества после приёма дозировки 500 мг сходна с концентрациями после приёма 250 мг (табл. 1.1) [49,138,151]. Эти существенные различия могут быть вызваны нестабильностью молекулы аналита в образцах биологических жидкостей.

В настоящее время опубликовано 4 статьи, описывающие методики анализа метилдопы в биологических жидкостях [49, 138, 166, 172] (табл 1.2). Таким образом, недостатками данных методик [49, 138, 166] является длительная и трудоёмкая пробоподготовка с применением твердофазной и жидкостно-жидкостной экстракции. При ВЭЖХ-МС/МС-определении МД [172] использовалось осаждение белков, однако нижний предел количественного определения (НПКО) при этом составил 320 нг/мл, что недоста-



точно для изучения биоэквивалентности таблетированных форм МД. Таким образом, разработка новой экспрессной и, при этом, чувствительной методики является актуальной.

Таблица 1.2

## Методики количественного определения метилдопы в биологических жидкостях

| № п/п | Объект    | Метод анализа | Калибровочный диапазон, нг/мл | Подготовка проб                                       | Наличие стабилизатора | Источник |
|-------|-----------|---------------|-------------------------------|---|-----------------------|----------|
| 1     | плазма    | ВЭЖХ-МС/МС    | 20-3000                       | ЖЖЭ метилхлоридом                                     | -                     | [138]    |
| 2     | сыворотка | ВЭЖХ-ФД       | 20-5000                       | ТФЭ с применением оксида алюминия в качестве сорбента | -                     | [49]     |
| 3     | плазма    | ВЭЖХ-ФД       | 10-5000                       | ТФЭ с применением оксида алюминия в качестве сорбента | -                     | [166]    |
| 4     | плазма    | ВЭЖХ-МС/МС    | 320-20480                     | ПП метанолом  | -                     | [172]    |

Ни в одной работе авторами не использовались растворы антиоксидантов для стабилизации данного аналита [49, 138, 166, 172], в отличие от биоаналитических исследований сходных по структуре соединений, допамина и леводопы [103, 168]. При этом значения фармакокинетических параметров таблеток метилдопы, полученные в ходе исследований биоэквивалентности, существенно различаются [49, 151, 166], что может быть связано с частичным разложением её молекулы в процессе хранения образцов.

### ***1.1.2. Общая характеристика мебеверина и особенности фармакокинетических исследований его препаратов***

Мебеверин является миотропным спазмолитиком. Механизм действия данного препарата основан на блокаде быстрых натриевых и медленных кальциевых каналов на мембране миоцита, что замедляет её деполяризацию и препятствует сокращению мышечных волокон. Он обладает высокой тропностью к гладкомышечным клеткам органов желудочно-кишечного тракта. Поэтому его используют, в основном, при спазмах различных отделов пищеварительной системы. Кроме антиспастического эффекта данный препарат оказывает прокинетическое действие, препятствуя развитию атонии [131, 162]. Основными лекарственными формами мебеверина являются капсулы и таблетки с пролонгированным высвобождением, а также таблетки, покрытые оболочкой [17].

Мебеверин является сложным эфиром. Он быстро гидролизует на этапе пресистемной элиминации при взаимодействии с ферментами - эстеразами до 3,4-

диметоксибензойной (вератровой) кислоты и мебеверинового спирта. Поэтому концентрации лекарственного вещества в плазме крови очень низкие. Далее мебевериновый спирт окисляется до мебевериновой кислоты (МК), которая впоследствии подвергается деметилированию с образованием деметилмебевериновой кислоты (ДМК) (рис.1.2). Действием данных метаболитов обусловлен фармакологический эффект препаратов мебеверина [114, 162, 179]. По данным Kristinsson J. с соавторами [114] ДМК выводится с мочой в виде конъюгата с глюкуроновой кислотой, что было установлено после ферментативного гидролиза проб мочи, полученных от добровольцев, с помощью  $\beta$ -D-глюкуронидазы.

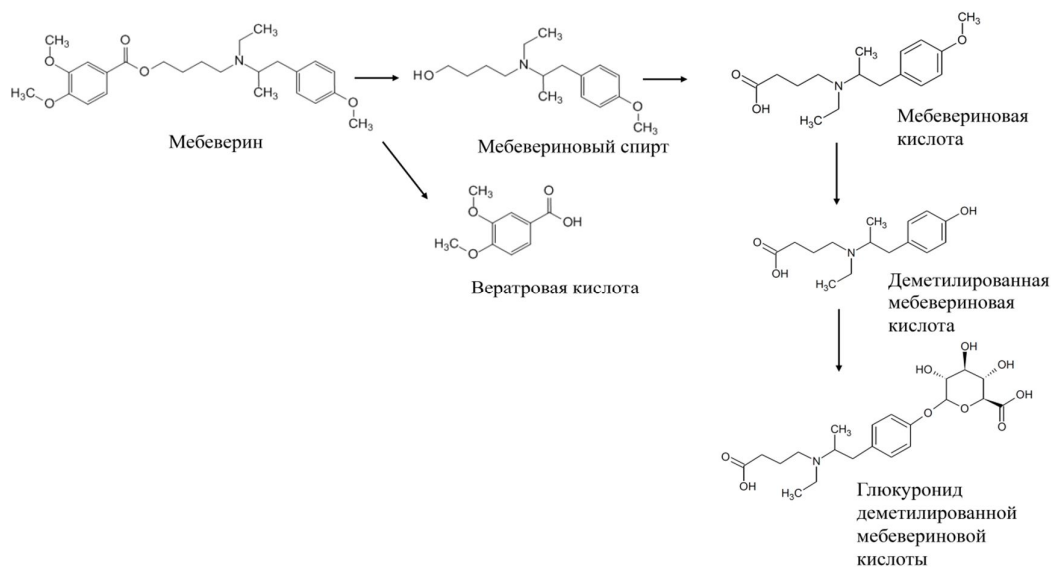


Рисунок 1.2. Схема метаболизма мебеверина

Несмотря на то, что мебеверин начал использоваться с 1965 г., его фармакокинетика изучена достаточно мало (табл. 1.3). Наибольшее количество публикаций посвящено исследованиям таблетированных форм данного лекарственного препарата [131, 160, 179]. Так, A. Winsemius с соавторами [179] проводили сравнение фармакокинетики таблеток и капсул с пролонгированным высвобождением мебеверина, анализируя фармакокинетические параметры только деметилированной мебевериновой кислоты как при однократном, так и при многократном употреблении ЛП. Величина  $C_{max}$  ДМК в плазме после приёма капсул в 3 раза ниже, величина  $AUC_{0-t}$  в 1,5 раза выше, а период полувыведения - в 2,5 раза длиннее, чем после приёма таблеток (табл. 1.3). Исследователи пришли к выводу, что двукратный приём капсул МБ с пролонгированным высвобождением в дозировке 200 мг эквивалентен трехкратному приёму таблеток в дозировке 135 мг. В исследовании A. Stockis с соавторами [160], напротив, определяли концентрации мебеве-

риновой кислоты и мебеверинового спирта после однократного употребления 3 таблеток в дозировке 135 мг.

Таблица 1.3

**Фармакокинетические параметры препаратов мебеверина**

| Лекарственная форма                       | Дозировка  | Метаболит | Фармакокинетические параметры |               |                       |                            | Объём выборки | Источник |
|---|------------|-----------|-------------------------------|---------------|-----------------------|----------------------------|---------------|----------|
|   |            |           | $C_{max}$ , нг/мл             | $T_{max}$ , ч | $AUC_{0-t}$ , нг·ч/мл | $AUC_{0-\infty}$ , нг·ч/мл |               |          |
| Капсулы с пролонгированным высвобождением | 200 мг     | ДМК       | 679,00                        | 2,92          | 4553,0                | 4863,0                     | 12            | [179]    |
| Таблетки, покрытые оболочкой              | 135 мг     | ДМК       | 1682,00                       | 1,17          | 3144,00               | 3190,00                    |               |          |
| Таблетки, покрытые оболочкой              | 200 мг     | ДМК       | 685,28                        | 2,91          | 6755,13               | 7669,41                    | 10            | [131]    |
|   |            | МК        | 28,79                         | 2,79          | 237,90                | 339,21                     |               |          |
|   |            | МС        | 6,61                          | 2,75          | 41,30                 | 47,57                      |               |          |
| Таблетки, покрытые оболочкой              | 135 мг × 3 | МК        | 2880,00                       | 1,25          | 8220,00               | -                          | 4             | [160]    |
|   |            | МС        | 3,00                          | 1,00          | 10,50                 | -                          |               |          |

Таблица 1.4

**Методики количественного определения мебеверина и его метаболитов в биологических жидкостях**

| Метод                                    | Объект     | Определяемые вещества                  | Аналитический диапазон, нг/мл | Метод подготовки проб   | Источник |
|--|------------|--|-------------------------------|---|----------|
| ВЭЖХ с кулонометрическим детектированием | плазма     | Мебеверин                              | 10,0 – 100,0                  | 2-х кратная ЖЖЭ н-гексаном  | [160]    |
|  |            | Мебеверинового спирта                  | 1,0 – 20,0                    |   |          |
|  |            | Мебеверинового спирта                  | 20,0 – 1000,0                 | 2-х кратная экстракция хлороформом                                |          |
| ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием  | сыворотка  | Мебеверин                              | 1250,0 – 10000,0              | ЖЖЭ смесью н-гексана и этилацетата (7:3)                          | [77]     |
|  |            | Мебеверинового спирта                  |                               |   |          |
|  |            | Вератровая кислота                     |                               |   |          |
| ВЭЖХ–МС/МС                               | плазма     | Мебеверинового спирта                  | 77,0- 6129,7                  | ТФЭ   | [105]    |
|  |            | Деметилированная мебеверинового спирта | 100,6 - 8051,6                |   |          |
|  |            | Вератровая кислота                     | 322,7- 25684,9                |   |          |
| ВЭЖХ-МС/МС                               | плазма     | Мебеверинового спирта                  | 1,0 - 100,0                   | Осаждение белков с последующим выпариванием надосадочной жидкости | [131]    |
|  |            | Деметилированная мебеверинового спирта | 5,0-1000,0                    |   |          |
|  |            | Мебеверинового спирта                  | 0,1-10,0                      |   |          |
| ВЭЖХ–МС/МС                               | субстанции | Мебеверин                              | 0,005-2,0                     | не указан   | [52]     |
|  |            | Деметилированная мебеверинового спирта | 10,0-5000,0                   |   |          |

В зарубежной литературе описаны несколько методик определения мебеверина и его основных метаболитов в плазме, а так же в сыворотке крови (табл. 1.4) [77, 105, 131,

160]. В качестве способов пробоподготовки авторы применяют жидкостно-жидкостную экстракцию н-гексаном, хлороформом [160], смесью н-гексана и этилацетата в соотношении (7:3) [77], твёрдофазную экстракцию с использованием картриджей Oasis HLB 1 cc (30 мг) [105], осаждение белков ацетонитрилом с последующим испарением надосадочной жидкости и реконструированием сухого остатка смесью метанола и воды (50:50, об./об.) [131]. В [77, 160] отсутствует возможность определения ДМК, а в [105] уровень НПКО для ДМК высокий и его недостаточно для проведения исследований биоэквивалентности. Однако, согласно данным последних публикаций данное вещество является основным метаболитом мебеверина [131, 162].

Общим недостатком опубликованных методик определения метаболитов мебеверина является длительная пробоподготовка и, в некоторых случаях, низкая чувствительность. Большинство данных методик не позволяют проводить одновременный анализ ДМК и МК. Поэтому разработка новой методики с использованием более простого и быстрого метода подготовки проб – осаждения белков, является актуальной.

### ***1.1.3. Общая характеристика препаратов микофеноловой кислоты и особенности определения микофеноловой кислоты и её метаболитов в биологических жидкостях***

Производные микофеноловой кислоты (6-(4-Гидрокси-6-метокси-7-метил-3-оксо-1,3-дигидро-2-бензофуран-5-ил)-4-метилгекс-4-еновой кислоты)- иммуносупрессивные лекарственные средства, которые применяются при трансплантации, преимущественно, почек [117], а также лечения аутоиммунных заболеваний [83, 119, 165]. Первый препарат данной группы, микофенолата мофетил (МФМ) (Рис. 1.3 Б) был внедрён в клиническую практику в 1995 г. («Селлсепт», Roche). Однако, высокая частота развития побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта (тошноты, рвоты, диареи) [157] послужила стимулом для разработки новой более безопасной формы МФК. Так, в 2004 г. был зарегистрирован микофенолат натрия (МФН) (рис. 1.3 А) в форме таблеток («Майфортик», Novartis), покрытых кишечнорастворимой оболочкой, который является менее токсичным для верхних отделов ЖКТ [185].

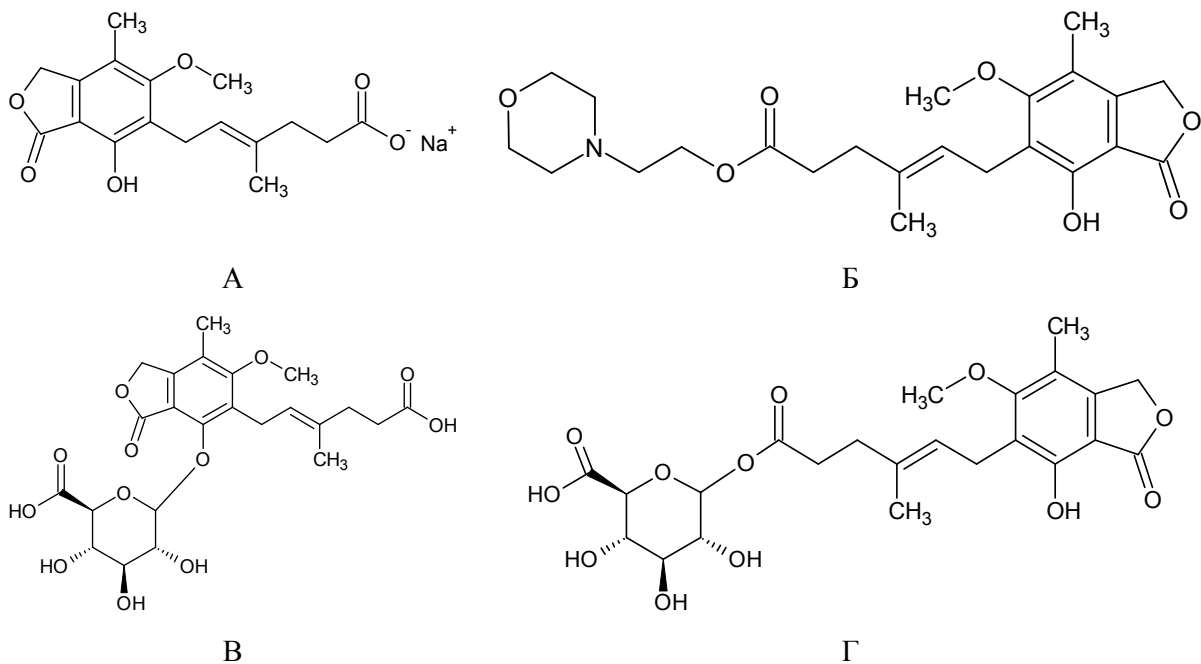


Рисунок 1.3. Структурные формулы мифенолата натрия (А), мифенолата мофетила (Б), фенольного глюкуронида (В) и ацилглюкуронида (Г) мифеноловой кислоты

Механизм действия данных препаратов основан на селективном, обратимом и конкурентном ингибировании фермента инозинмонофосфатдегидрогеназы, необходимого для синтеза гуанозина, а также внедрения его в молекулу ДНК. В результате подавляется рост и деление лимфоцитов, индуцируется их апоптоз, что приводит к снижению иммунного ответа [67]. При этом МФМ является пролекарством и после всасывания гидролизует с образованием мифеноловой кислоты. МФК преимущественно метаболизируется печенью с участием глюкуронилтрансферазы до основного фармакологически неактивного метаболита - фенольного глюкуронида (рис. 1.3 В)[48, 56, 65, 70, 75, 92, 115, 116, 128, 137, 143, 154, 157, 177, 183]. Минорным метаболитом данного соединения является О-ацилглюкуронид (рис. 1.3 Г): его концентрации в плазме после однократного приёма лекарственных препаратов МФК не превышают 1,5 мкг/мл [50, 70]. Однако, АГМФК является фармакологически активным [128, 143, 157]. По данным М. Shipkova [157] его концентрации в плазме тесно связаны с проявлением побочных эффектов со стороны ЖКТ и системы кроветворения.

Препараты МФН и МФМ обладают высоковариабельной фармакокинетикой. Это обусловлено энтерогепатической рециркуляцией её конъюгатов. Вследствие этого через 6-12 ч после приема препаратов отмечается прирост концентрации из-за повторного всасывания деконъюгированной МФК [111]. Мифеноловая кислота обладает высокой

степенью связывания с белками плазмы крови, преимущественно, с альбуминами. Доля свободной фракции составляет 1-3% от общего количества [53]. Так, величина  $C_{max}$  несвязанной МФК после приёма таблеток МФМ в дозировке 1000 мг достигает 122,5 нг/мл,  $AUC_{0-t}$  - 409,2 нг\*ч/мл [178]. Фармакологический эффект препаратов обусловлен именно действием несвязанной МФК [92, 155, 178].

Опубликованные данные о значениях основных фармакокинетических параметров МФК после референтных препаратов МФМ в форме таблеток в дозировке 500 мг, полученные в рамках многочисленных исследований биоэквивалентности и фармакокинетики, отличаются друг от друга (табл. 1.5). Так, значения  $C_{max}$  варьируют от  $9,11 \pm 4,2$  мкг/мл до  $26,47 \pm 3,67$  мкг/мл,  $T_{max}$  – от 0,5 до 1,84 ч,  $AUC_{0-t}$  – от  $11,53 \pm 5,3$  до  $28,89 \pm 7,98$  мкг\*ч/мл [45, 48, 145, 165]. Необходимо отметить, что подходы к проведению исследований биоэквивалентности препаратов микофенолата мофетила отличаются. Так, S. Patel с соавторами [145], S. Almeida с соавторами [45] сравнивают фармакокинетические параметры микофенолата мофетила и микофеноловой кислоты, G. Bahrami и B. Mohammadi [48] – проводят оценку БЭ по МФК и ФГМФК, V. Upadhyay с соавторами [165] и Q. Zhang с соавторами [186] измеряли концентрации в плазме только МФК. Согласно требованиям нормативных документов [22, 86, 88], если ЛП является пролекарством и его концентрации в плазме не значительны, как в случае МФМ, то изучение БЭ проводят по основному активному метаболиту, т.е. микофеноловой кислоте. Сравнение ФК параметров неактивного метаболита ФГМФК при этом не требуется. Репликативный дизайн использовался только в одном исследовании [45]. Объем выборки варьировал от 28 до 126 добровольцев (табл. 1.5). В каждой из работ тестируемый препарат был признан биоэквивалентным [45,48,145,165,148].

Таблица 1.5

Фармакокинетические параметры таблеток микофенолата мофетила

| Дозировка,<br>мг | Фармакокинетические параметры референтных ЛП |               |                        |                             | Объем<br>выборки | Источ-<br>ник |
|------------------|--|---------------|------------------------|-----------------------------|------------------|---------------|
|                  | $C_{max}$ , мкг/мл                           | $T_{max}$ , ч | $AUC_{0-t}$ , мкг*ч/мл | $AUC_{0-\infty}$ , мкг*ч/мл |                  |               |
| 500              | $17,59 \pm 7,55$                             | 0,5           | $28,70 \pm 6,81$       | $30,60 \pm 6,97$            | 126              | [145]         |
| 500              | $15,88 \pm 6,38$                             | 0,5           | $28,89 \pm 7,98$       | $33,19 \pm 9,94$            | 103              | [45]          |
| 500              | $9,11 \pm 4,2$                               | 0,67          | $11,53 \pm 5,3$        | $13,04 \pm 6,3$             | 24               | [48]          |
| 1000             | $26,47 \pm 3,67$                             | 0,81          | $58,38 \pm 9,28$       | $62,41 \pm 10,28$           | 18               | [186]         |
| 500              | $10,75 \pm 3,60$                             | 1,84          | $23,91 \pm 5,09$       | $26,53 \pm 7,17$            | 72               | [165]         |

На настоящий момент в литературе не опубликованы результаты исследований биоэквивалентности препаратов микофенолата натрия. Дженериков данного препарата также не зарегистрировано [17]. В работе X. Delavene с соавторами [70] описаны резуль-

таты ТЛМ, проводимого в течении 30 дней у пациентов после трансплантации почки при приёме суточной дозы микофенолата натрия 720 мг. При этом значение  $C_{\max}$  варьировало в диапазоне от  $10,7 \pm 7,6$  мкг/мл до  $13,4 \pm 6,3$  мкг/мл, величина  $AUC_{0-t,ss}$  - в диапазоне от  $28,8 \pm 9,7$  мкг\*ч/мл до  $40,6 \pm 14,7$  мкг\*ч/мл. Медиана времени достижения максимальной концентрации МФК составила 2 ч.

Количественное определение микофеноловой кислоты, а также её метаболитов в биологических объектах можно осуществлять различными инструментальными методами анализа. Так, в настоящее время опубликованы методики анализа данных веществ с помощью капиллярного электрофореза, ВЭЖХ со спектрофотометрическим, флуориметрическим и тандемным масс-спектрометрическим детектированием (табл. 1.6) и иммунохимических методов [54, 55, 140, 148, 170]. Авторы наиболее часто используют в качестве способа подготовки проб осаждение белков [56, 60, 62, 65, 70, 74, 75, 92, 94, 116, 126, 136, 149, 155 - 157, 165, 177, 188], реже – твёрдофазную [50, 67, 128, 143, 178] и жидкостно-жидкостную экстракцию [48, 53, 92, 115, 137, 188]. При определении свободной фракции МФК ультрафильтрат непосредственно вводят в хроматографическую систему [155], разводят растворами ВС [92], а также подвергают ТФЭ [178]. В качестве экстрагента при анализе МФК и её метаболитов из биологических жидкостей применяются этилацетат [137], диэтиловый эфир [115], метиленхлорид [188], 1-хлобутанол [53] смесь этилацетата с изопропанолом [48]. Однако, ни в одной из работ не была изучена зависимость степени извлечения от рН среды и природы органического растворителя, а также времени экстракции. Для ТФЭ также применяются различные виды сорбентов: полистиролы (HLB) [67], силикагели -  $C_2$ ,  $C_{18}$  [128, 143, 178], производные N-винилпирролидона [50], выбор которых также не был экспериментально обоснован.

Разработанные биоаналитические методики определения МФК, ФГМФК и АГМФК имеют сильно различающиеся калибровочные диапазоны. Так, значения уровня НПКО для микофеноловой кислоты варьируют от 0,015 до 0,7 мкг/мл, а значения ВПКО – от 6,0 до 120,0 мкг/мл (табл. 1.6). Это может быть связано с тем, что большинство методик с широким калибровочным диапазоном применялись для проведения терапевтического лекарственного мониторинга у пациентов, принимавших лекарственные препараты микофенолата натрия и микофенолата мофетила регулярно. При этом суточная доза МФК доходила до 1000 мг [62, 67, 74, 92, 128, 136, 143, 157]. При изучении

биоэквивалентности и фармакокинетики, как правило, использовались более узкие динамические диапазоны концентраций [45, 143, 149, 165].

Таблица 1.6

Аналитические методики определения микофеноловой кислоты и её метаболитов  
в биологических жидкостях

| № п/п  | Объект    | Определяемые вещества | Калибровочный диапазон | Подготовка проб   | Наличие стабилизатора   | Источник |
|--|-----------|-----------------------|------------------------|---|---|----------|
| Капиллярный электрофорез со спектрофотометрическим детектированием |           |                       |                        |   |   |          |
| 1  | плазма    | МФК                   | 0,7-120,0 мкг/мл       | ПП раствором хлорной кислоты  | -   | [62]     |
| 2  | сыворотка | МФК                   | 0,8-40,0 мкг/мл        | ПП ацетонитрилом  | -   | [136]    |
|  |           | ФГМФК                 | 4,0-120,0 мкг/мл       |   |   |          |
| 3  | сыворотка | МФК                   | 0,4-55,3               | ЖЖЭ этилацетатом с последующим концентрированием  | Р-р ортофосфорной кислоты 850 г/л (10 мкл р-ра на 540 мкл сыворотки + ЭДТА) | [137]    |
|  |           | ФГМФК                 | 5,0-267,0              |   |   |          |
|  |           | АГМФК                 | 0,4-20,0               |   |   |          |
| 4  | сыворотка | МФК                   | 0,5-6,0 мкг/мл         | ПП ацетонитрилом  | -   | [156]    |
| ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием                     |           |                       |                        |   |   |          |
| 5  | плазма    | МФК                   | 0,04 - 50,0 мкг/мл     | ПП растворами карбоксибуксиминокфеноловой кислоты в ацетонитриле  | Р-р ортофосфорной кислоты 850 г/л до рН 2,5+ЭДТА                            | [157]    |
|  |           | ФГМФК                 | 1,0 - 500,0 мкг/мл     |   |   |          |
|  |           | АГМФК                 | 0,05-10,0 мкг/мл       |   |   |          |
| 6  | плазма    | МФК                   | 0,2-200 мкг/мл         | ТФЭ с применением НЛВ-картриджей  | -   | [67]     |
| 7  | плазма    | МФК                   | 0,2-50,0 мкг/мл        | ТФЭ с применением картриджей Isolute C2 (100 мг)  | -   | [143]    |
|  |           | ФГМФК                 | 2,0-500 мкг/мл         |   |   |          |
|  |           | АГМФК                 | 0,5-25,0 мкг/мл        |   |   |          |
| 8  | сыворотка | МФК                   | 0,05-51,20 мкг/мл      | ЖЖЭ смесью этилацетат : изопропанол (1:4) с последующим концентрированием   | -   | [48]     |
|  |           | ФГМФК                 | 0,125-64,000 мкг/мл    |   |   |          |
| 9  | плазма    | МФК                   | 0,2-50,0 мкг/мл        | ПП 5% раствором цинка сульфата в метаноле   | Р-р ортофосфорной кислоты 20% (5 мкл р-ра на 100 мкл плазмы) + ЭДТА         | [65]     |
|  |           | ФГМФК                 | 2,8-531,0 мкг/мл       |   |   |          |
|  |           | АГМФК                 | 0,3-24,0 мкг/мл        |   |   |          |
| 10   | плазма    | МФК                   | 1,0-40,0 мкг/мл        | ПП смесью фосфатного буферного раствора рН 3,0 с ацетонитрилом (20:80 об./об.)  | -   | [74]     |
| 11   | плазма    | МФК                   | 0,5-40,0 мкг/мл        | ПП добавлением раствора глюкуронида фенолфталеина (ВС) в метаноле и 0,1М фосфатного буферного раствора в ацетонитриле | -   | [75]     |
|  |           | ФГМФК                 | 10,0-280,0 мкг/мл      |   |   |          |
|  |           | АГМФК                 | 0,5-20,0 мкг/мл        |   |   |          |



| № п/п   | Объект             | Определяемые вещества | Калибровочный диапазон | Подготовка проб  | Наличие стабилизатора  | Источник |
|---|--------------------|-----------------------|------------------------|--|--|----------|
| 12  | плазма             | МФК                   | 0,05-50,00 мкг/мл      | ТФЭ с применением картриджей Ser-Pak plus C18, (360 мг)  | Р-р уксусной кислоты 10% (25 мкл р-ра на 1 мл плазмы) + ЭДТА | [128]    |
|   |                    | ФГМФК                 | 0,1-400,0 мкг/мл       |  |  |          |
|   |                    | АГМФК                 | 0,08-8,00 мкг/мл       |  |  |          |
| 13  | плазма             | МФК                   | 0,1-60,0 мкг/мл        | ПП ацетонитрилом   | -  | [186]    |
| 14  | плазма             | МФК                   | 0,5-50,0 мкг/мл        | Растворение сухого остатка в метаноле  | Лиофильная сушка проб плазмы                                 | [174]    |
| 15  | плазма             | МФК                   | 0,5-40,0 мкг/мл        | ПП раствором гексобарбитала в ацетонитриле   | -  | [149]    |
|   |                    | ФГМФК                 | 5,0-350,0 мкг/мл       |  |  |          |
| <b>ВЭЖХ с флюориметрическим детектированием</b>                 |                    |                       |                        |  |  |          |
| 16  | плазма             | МФК                   | 0,2-20,0 мкг/мл        | ПП охлаждённым ацетонитрилом   | -  | [94]     |
| 17  | плазма             | МФК общая             | 0,05-40,0 мкг/мл       | ПП раствором напроксена (BC) в метаноле  | -  | [155]    |
|   |                    | МФК свободная         | 5,0-1000,0 нг/мл       | Ультрафильтрация   |  |          |
| 18  | плазма             | МФК                   | 0,5-30,0 мкг/мл        | ЖЖЭ дихлорметаном с последующей дериватизацией 4-бромометил - 6, 7-диметоксикумарином  | -  | [188]    |
|   |                    | Вальпроевая кислота   | 5,0-150,0 мкг/мл       |  |  |          |
| <b>УЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием</b> |                    |                       |                        |  |  |          |
| 19  | плазма, сы-воротка | МФК                   | 0,05-100,0 мкг/мл      | ПП раствором глюкоронида фенолфталеина и N-фталойл- L - фенилаланина (BC) в смеси метанол : вода с добавкой муравьиной кислоты и ацетата аммония | -  | [116]    |
|   |                    | ФГМФК                 | 4,0-4000,0 мкг/мл      |  |  |          |
| 20  | плазма             | МФК                   | 0,1-20,0 мкг/мл        | ПП раствором МФК-D <sub>3</sub> в метаноле   | -  | [70]     |
|   |                    | ФГМФК                 | 1,0-200,0 мкг/мл       |  |  |          |
|   |                    | АГМФК                 | 0,1-20,0 мкг/мл        |  |  |          |
| 21  | плазма             | МФК                   | 0,015 - 15,0 мкг/мл    | ПП раствором МФК-D <sub>3</sub> в метаноле   | -  | [165]    |
| 22  | плазма             | МФК                   | 0,101-19,955 мкг/мл    | ТФЭ с применением картриджей Strata-X 33 мкм (30 мг)   | -  | [123]    |
|   |                    | МФМ                   | 0,1-20,0 нг/мл         |  |  |          |
| <b>ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием</b> |                    |                       |                        |  |  |          |
| 23  | плазма             | МФК свободная         | 2,5-200,0 нг/мл        | Ультрафильтрация с последующей ТФЭ с применением картриджей Waters C <sub>18</sub>   | -  | [178]    |
| 24  | слюна              | МФК                   | 2,5-800,0 нг/мл        | ПП раствором ацетонитрила с последующим концентрированием  | -  | [126]    |

| № п/п | Объект                                     | Определяемые вещества | Калибровочный диапазон | Подготовка проб   | Наличие стабилизатора   | Источник |
|-------|--|-----------------------|------------------------|---|---|----------|
| 25    | плазма                                     | МФК                   | 0,1-50,0 мкг/мл        | ПП растворами хлорной кислоты 150 г/л и раствором карбоксибуксимикофеноловой кислоты в ацетонитриле   | Р-р ортофосфорной кислоты 14,5 г/л + ЭДТА   | [56]     |
|       |  | ФГМФК                 | 1,0-500,0 мкг/мл       |   |   |          |
|       |  | АГМФК                 | 0,5-10,0 мкг/мл        |   |   |          |
| 26    | Мононуклеарные клетки периферической крови | МФК                   | 0,25-80,0 нг/проба     | Лизис клеток применением Tris - буферного раствора с последующим высушиванием лизата и реконструированием смеси формиата аммония и ацетонитрила (85:15 об./об.) | -   | [51]     |
| 27    | Плазма                                     | МФК                   | 0,05-50,0 мкг/мл       | ТФЭ с применением картриджей Strata-X (60 мг)   | Р-р ортофосфорной кислоты 85% (8 мкл р-ра на 500 мкл плазмы; 32 мкл р-ра на 4 мл мочи) + ЭДТА | [50]     |
|       |  | ФГМФК                 | 0,05-50,0 мкг/мл       |   |   |          |
|       |  | АГМФК                 | 0,01-10,0 мкг/мл       |   |   |          |
|       | Моча                                       | МФК                   | 0,125-50,0 мкг/мл      |   |   |          |
|       |  | ФГМФК                 | 0,05-20,0 мкг/мл       |   |   |          |
|       |  | АГМФК                 | 0,1-40,0 мкг/мл        |   |   |          |
| 28    | Плазма, сыворотка                          | МФК                   | 0,05-100,0 мкг/мл      | ЖЖЭ диэтиловым эфиром   | -   | [115]    |
|       |  | ФГМФК                 | 6,0-400,0 мкг/мл       |   |   |          |
| 29    | Плазма                                     | МФК                   | 0,05-19550 нг/мл       | ТФЭ с применением картриджей Waters MAX Oasis   | -   | [45]     |
|       |  | МФМ                   | 20 - 4000 пг/мл        |   |   |          |
| 30    | плазма, кровь                              | МФК общая             | 0,1 - 40,0 мкг/мл      | ПП раствором МФК-D <sub>3</sub> в метаноле с добавкой 0,1% муравьиной кислоты   | -   | [92]     |
|       |  | ФГМФК общий           | 1,0 - 400,0 нг/мл      |   |   |          |
|       |  | МФК свободная         | 1,0 - 400,0 мкг/мл     |   |   |          |
|       | Сухие пятна плазмы и крови                 | МФК общая             | 0,1 - 40,0 мкг/мл      | Разведение сухих остатков раствором МФК-D <sub>3</sub> в метаноле с добавкой 0,1% муравьиной кислоты  |   |          |
|       |  | ФГМФК общий           | 1,0 - 400,0 нг/мл      |   |   |          |
|       |  |                       |                        |   |   |          |
| 31    | плазма                                     | МФК                   | 0,75-20,0 мкг/мл       | ЖЖЭ   | -   | [145]    |
|       |  | МФМ                   | 0,1-10,0 нг/мл         |   |   |          |
| 32    | плазма                                     | МФК                   | 0,01-7,0 мкг/мл        | ПП  | -   | [60]     |
| 33    | Плазма                                     | МФК                   | 0,08 - 20 мкг/мл       | ПП раствором МФК-C <sup>13</sup> D <sub>3</sub> в ацетонитриле  | -   | [177]    |
|       |  | ФГМФК                 | 0,4 - 100 мкг/мл       |   |   |          |
|       | Слюна                                      | МФК                   | 5,0 - 400,0 нг/мл      |   |   |          |
|       |  | ФГМФК                 | 5,0 - 400,0 нг/мл      |   |   |          |
| 34    | Плазма                                     | МФК сво-              | 0,5-100,0 нг/мл        | Ультрафильтрация с  | -   | [53]     |

| № п/п | Объект | Определяемые вещества | Калибровочный диапазон | Подготовка проб               | Наличие стабилизатора | Источник |
|-------|--------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------|
|       |        | бодная                |                        | последующей ЖЖЭ 1-хлорбутаном |                       |          |
|       |        | Циклоспорин свободный | 0,1-10,0 нг/мл         |                               |                       |          |

В большинстве из опубликованных работ, в которых осуществлялось количественное определение только МФК, не проводилось изучение обратной конверсии АГМФК и ФГМФК как в процессе хранения, так и в процессе анализа [45, 62, 65, 67, 74, 94, 123, 136, 165, 178, 188]. В ряде статей применяется закисление пробы растворами уксусной и ортофосфорной кислоты в комбинации с ЭДТА в качестве антикоагулянта для предотвращения гидролиза данных метаболитов [50, 56, 65, 128, 137, 156]. Использовалась также техника сухих пятен, которая заключается в высушивании образцов биологических жидкостей, что полностью исключает возможность гидролитического разложения [92, 118]. Авторы данных публикаций отмечают, что наиболее подвержен деградации АГМФК.

В работе Y. Mino с соавторами [128] указано, что 95% от исходного количества АГМФК в неподкисленной плазме сохраняется после 8 ч хранения при температуре 4°C, однако при 20 °C разлагается более 30% от его начального количества. При добавлении к плазме 10% раствора уксусной кислоты данное соединение было стабильно в течение 24 ч при температуре 4°C. В исследовании G. Bahrami и B. Mohammadi [48] утверждается, что АГМФК разлагается более чем на 50% в течение 44 ч при комнатной температуре, в то время как, после осаждения плазмы ацетонитрилом его концентрация оставалась стабильной в течение 44 ч при 4°C, независимо от подкисления перед пробоподготовкой. Однако, некоторые публикации утверждают об отсутствии гидролиза конъюгатов МФК. Так, K. Heinig с соавторами [92] не наблюдали обратной конверсии ФГМФК и АГМФК при хранении образцов плазмы при комнатной температуре в течение 24 ч.

В ряде исследований проводилась оценка краткосрочной, долгосрочной стабильности и стабильности при замораживании/размораживании МФК, а также продуктов её конъюгации в биологических жидкостях [48, 50, 70, 75, 115, 116, 137, 143, 177]. Однако, прирост концентрации МФК за счёт гидролиза её основных метаболитов при хранении в данных работах не был изучен. Это является важным при исследованиях биоэквивалентности, в которых заключение выносится по результатам сравнения фармакокинети-

ческих параметров лекарственного вещества. Согласно Руководствам ЕМА [87], Руководствам по экспертизе лекарственных средств НЦЭСМП (Т.1) [24], Решению Совета Евразийской экономической комиссии № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [22] изучение обратной конверсии является обязательным при валидации методики при наличии у лекарственного вещества нестабильных метаболитов. Исходя из требований к селективности, величина прироста сигнала при анализе холостых образцов с добавлением глюкуронидов не должна превышать 20% от уровня сигнала образца НПКО. Так же в ряде работ, в которых в качестве метода анализа применяли ВЭЖХ-МС/МС, не была изучена стабильность АГМФК и ФГМФК в источнике ионов, в котором данные соединения из-за жёстких условий ионизации (высоких температур в источнике ионов, а также в ионной оптике, и высокого напряжения на капилляре) могут подвергаться фрагментации, переходя в исходное лекарственное вещество, и тем самым искажать результаты измерений [45, 51, 53, 145, 178].

Таким образом, в большинстве исследований изучения обратной конверсии основных метаболитов МФК не проводилось, а в работах, где оно было выполнено, результаты не совпадают. Методики количественного определения МФК методом ВЭЖХ-МС и ГХ-МС не разработаны. Поэтому, не смотря на множество статей, посвящённых биоаналитическим исследованиям препаратов МФК, создание новых методик с использованием выше указанных методов для измерения концентрации данного соединения в плазме крови, а также рекомендаций по хранению образцов, полученных от добровольцев/пациентов, является актуальным.

## **1.2. Способы стабилизации биологических проб при проведении биоаналитических исследований**

Изменение химической структуры веществ в биологических жидкостях может быть обусловлено как влиянием внутренних факторов, главным образом, активностью ферментных систем и величиной рН, так и действием внешних факторов, таких как температура и свет. Примерами нестабильных соединений являются фенолы, тиолы, N-оксиды, сложные эфиры, лактоны, продукты II фазы метаболизма (глюкурониды, сульфаты и т.д.). Также известны случаи интерконверсии стереоизомеров [43, 71, 93, 118].

К представителям **легкоокисляющихся соединений** наряду с фенольными относятся производные птеридина. Для предотвращения их разложения в работе Н. Tomsikova с соавторами [164] рекомендуют использовать дитиоэритреитол, дитиотреитол, обладающие восстановительными свойствами за счёт наличия сульфгидрильных групп, аскорбиновую кислоту, которая так же является антиоксидантом, и диэтилентриаминпентауксусную кислоту (комплексон). Так, для предупреждения окисления тетрагидробиоптерина до дигидробиоптерина в плазме применялась смесь растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 0,04% и дитиоэритреитола в концентрации 0,1% [80], а в цереброспинальной жидкости - смесь растворов дитиоэритреитола и диэтилентриаминпентауксусной кислоты [164]. Температура хранения образцов в первом случае составила  $-70^{\circ}\text{C}$  [80], во втором -  $-80^{\circ}\text{C}$  [164].

Для предотвращения димеризации тиолов часто используется дериватизация. Так, для стабилизации меркаптогруппы каптоприла в качестве дериватирующего агента применяли N,N,N',N'-тетраметил-2-бутендиамин [44], N-этилмалеимид [63], дитиоэритреитол [76], для стабилизации меркаптогруппы омапатрилата - метилирующий агент метилакрилат [99], а так же N-этилмалеимид [93], для стабилизации меркаптогруппы активного метаболита прасургела, R-138727 - 2-бromo-3'-метоксиацетофенон [176]. При этом дериватирующие агенты добавляются непосредственно после центрифугирования образцов крови в криопробирки.

В некоторых случаях разложения удаётся избежать без использования антиоксидантов и дериватизации за счёт подбора условий хранения и антикоагулянта. Так, при анализе 4 $\beta$ -гидроксихолестерола окисление предупреждено за счёт применения ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранения проб при температуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ . При процессе хранения при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  данное вещество было подвержено значительной деградации [167].

Обратная конверсия N-оксидов возможна при воздействии повышенных температур, в процессе пробоподготовки проб и проведения анализов. Их стабильность зависит от pH среды при экстракции, а также природы раствора, используемого для коррекции pH. Данные метаболиты быстро разлагаются при щелочной pH среды [71, 93]. N-оксид хлорпротиксена при подщелачивании плазмы раствором натрия гидроксида почти полностью переходит в исходное лекарственное вещество, а при подщелачивании раствором натрия гидрокарбоната остаётся стабильным. При экстракции рекомендуется из-

бегать воздействия высоких температур, например, путём охлаждения экстрагента [71]. Разложения данного метаболита в плазме при хранении удаётся избежать путём применения раствора аскорбиновой кислоты.

Известны случаи нестабильности лекарственных веществ в биологических объектах под действием света. Примерами данных соединений являются монтелукаст, витамины группы D, бендрофлуметиазид, изосорбида-5-мононитрат и динитрат [104, 118]. Для хранения биологических жидкостей применяют пробирки, либо обёрнутые алюминиевой фольгой, либо изготовленные из материала, не пропускающего свет (тёмного стекла или окрашенного полипропилена). Охлаждение проб снижает скорость протекания фотохимических реакции [118]. В лабораториях при этом также применяют специальные источники освещения, не выделяющие излучения в УФ-диапазоне.

Стабильность глюкуронидов и других конъюгатов лекарственных веществ, лактонов и сложных эфиров зависит от уровня pH биологической жидкости. Активность ферментных систем и скорость протекания pH-зависимых реакций напрямую связано со значением pH [93].

При биоаналитических исследованиях статинов может происходить как явление гидролиза лактонного кольца, так и обратная циклизация  $\beta$ -гидроксикислоты в лактон. Обратную конверсию данной группы веществ предотвращают снижением pH среды путём добавления к образцам плазмы буферных растворов со значением pH от 4,0 до 5,0 [96, 100, 118, 133, 142]. Р. Paratani с соавторами [141] при количественном определении симвастатина в плазме для данных целей использовали водный раствор муравьиной кислоты в концентрации 5%. Ингибиторы эстераз также применяют для стабилизации сложных эфиров и лактонов. К ним относятся натрия фторид и его смеси с калия оксалатом и  $K_2$ ЭДТА, параоксон, фенилметансульфонил фторид, бис-(4-нитрофенил)-фосфат, диизопропилфторфосфат, дихлофос и т.д. [81, 118, 120, 161, 184]. Например, для устранения гидролиза симвастатина в плазме крови можно использовать смеси натрия фторида и калия оксалата, смеси натрия фторида, калия оксалата и  $K_2$ ЭДТА [118], параоксон [160], для устранения гидролиза осельтамивира - дихлофос [120], для устранения гидролиза ацетилсалициловой кислоты - натрия фторид [112] или его смесь калия оксалатом [159].

Примерами веществ, которые подвержены **интерконверсии** в биологических жидкостях являются оксазепам [146], росиглитазон и пиоглитазон [98] и 13-транс-

ретиноевая кислота [173]. Для устранения рацемизации глитазонов в плазме применяли закисление рН среды до 2,5 [98], для стабилизации оксазепамма - 0,1 н. раствор хлористоводородной кислоты [146], а для предотвращения перехода 13-*транс*-ретиноевой кислоты в 13-*цис*-ретиноевую кислоту - смесь натрия аскорбината и N-этилмалеимида [173].

Таким образом, при исследованиях биологических жидкостей, содержащих нестабильные вещества, хранение образцов целесообразно осуществлять при глубокой заморозке до температуры не выше -70°C [164, 167, 180] или не выше -90°C [43, 63, 76]. Если с помощью изменений температурного режима не удастся предотвратить разложение, к пробам добавляют растворы стабилизаторов в зависимости от особенностей структуры анализируемого вещества. Так, окисление веществ в биологических жидкостях можно предотвратить используя растворы антиоксидантов [76, 103, 134, 164, 168], а так же немедленное добавление к плазме дериватирующего агента (тиолы) [44, 63, 76, 93, 99, 176]. Гидролиз сложных эфиров и лактонов устраняют применением ингибиторов эстераз [81, 118, 120, 161] и коррекцией рН [96, 100, 101, 118, 133, 141, 142] в плазме. Интерконверсию стереоизомеров предупреждают закислением среды до рН 2,0-2,5 [118, 146, 173]. При биоаналитических исследованиях чувствительных к свету соединений необходимо использовать непроницающие свет вакуумные пробирки и посуду и не допускать прямого попадания ультрафиолетовых лучей на образец, а также воздействия высоких температур [104, 118].

### **1.3. Характеристика изучаемых классов потенциально нестабильных соединений**

#### ***1.3.1. Химические свойства фенольных соединений и причины их возможной нестабильности***

Фенолы – производные ароматических углеводов, у которых один или несколько атомов водорода в ароматическом кольце замещены на гидроксильную группу. Фенольные соединения за счёт электронодонорного эффекта фенольного гидроксила легко окисляются даже в мягких условиях. Причём двухатомные и многоатомные фенолы, особенно при наличии фенольных гидроксильных групп в *орто*- и *пара*-положениях, обладают более сильными восстановительными свойствами, чем одноатомные [118]. Продуктами данных реакций являются вещества хиноидной структуры [132].

Результаты испытаний стабильности активных фармацевтических субстанций (АФС), содержащих в структуре один [147] и два [90, 113] фенольных гидроксила в одном бензольном кольце, показали, что основной причиной разложения является взаимодействие с концентрированным раствором щёлочи [113, 147] и пероксида водорода [90]. В кислой среде, а также при воздействии УФ-излучения данные соединения являются относительно стабильными. В работе А. Alnaizu и А. Akgermanu [46] показано, что процесс деградации фенола под действием УФ - излучения значительно ускоряется при добавлении раствора пероксида водорода в молярных фенол/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> соотношениях от 1:50 до 1:495, а также нагревания до 45°C.

Основными причинами окисления как фенольных, так и других соединений в биологических жидкостях являются взаимодействие молекул аналита со свободными радикалами в присутствии кислорода, с активными формами кислорода (супероксид-ион, пероксид-ион, радикал гидроксильной группы и т.д), которые, в основном, образуются под действием света, а также само ультрафиолетовое излучение [118]. По данным D. Dell [71] этот процесс ускоряет также щелочная рН, что также прослеживается при изучении стабильности АФС [113, 147]. Важную роль играет температура хранения образцов [58].

Для стабилизации ЛВ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы, в биологических жидкостях обычно используется добавление растворов антиоксидантов. Так, для предотвращения окисления молекулы допамина в плазме применялся 5% раствор натрия метабисульфита [168], а при исследовании леводопы – смесь глутатиона с этиленгликольтетраацетатом (ЭГТА) и гепарином [103]. Для изучения экскреции полифенольных соединений, катехинов, и двухатомного фенольного соединения - 3,4- диоксикоричной кислоты к моче добавляли смесь растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 10% и хлористоводородной кислоты в концентрации 1 моль/л [134].

### ***1.3.2 Факторы, влияющие на стабильность глюкуронидов лекарственных веществ в биологических жидкостях***

Образование глюкоронидов – один из путей конъюгации ксенобиотиков, приводящий к образованию более гидрофильных молекул и способствующий тем самым их более быстрому выведению из организма [14]. При этом молекулы глюкуроновой кислоты связываются с функциональными группами, обладающих нуклеофильными свой-



ствами, такими как карбоксильная группа [93, 118], спиртовые [91] и фенольные гидроксилы [107], и реже, меркаптогруппы (например, метаболит дисульфирама - диэтилдитиокарбаминовая кислота) и аминогруппы (например, сертралин, карведилол) [47], в результате чего образуются О-ацилглюкурониды, О-глюкурониды, S- глюкурониды, N-глюкурониды, соответственно. Реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения ( $S_N$ ) и приводит к образованию гликозидной связи [14].

Устойчивость к гидролизу данных метаболитов возрастает в ряду: О-ацилглюкурониды > О-глюкурониды > S- глюкурониды > N- глюкурониды [122]. О-ацилглюкурониды лекарственных веществ в плазме могут также подвергаться изомеризации за счёт миграции сложноэфирной связи в положения С-2, С-3, С-4 глюкуронового кольца с образованием  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров (например 1-О-ацилглюкуронид телмисартана и 1-О-ацилглюкуронид диклофенака) [73, 118].

Стабильность данных метаболитов в биологических жидкостях, главным образом, зависит от рН среды [71, 93, 118]. Так,  $\beta$ -1-О-ацилглюкурониды наиболее устойчивы при кислых значениях рН. Поэтому для предотвращения гидролиза данных метаболитов рН среды снижают до значения ниже 6,0 путём добавления к пробе водных растворов фосфорной [65, 137, 156], уксусной кислот [128], а также буферных растворов [118]. На устойчивость О-ацилглюкуронидов, являющихся сложными эфирами, влияет активность эстераз. Поэтому при биоаналитических исследованиях веществ, образующих глюкурониды, в качестве антикоагулянта наиболее часто используют ЭДТА, который обладает способностью ингибировать данную группу ферментов [71, 118]. В некоторых случаях используют технику «сухих пятен» (высушивание образца биологической жидкости с последующим реконструированием) [92]. Понижение температуры хранения проб, содержащих глюкуроновые конъюгаты, также значительно замедляет процесс гидролиза [26, 40].

Таким образом, О-ацилглюкурониды лекарственных веществ являются наименее стабильными [118, 122]. Однако, фенольные глюкурониды также подвергаются гидролизу в биологических жидкостях [26, 40, 107, 108, 118]. Так, при определении парабе-нов, триклозана и бисфенола А пробы мочи рекомендуется подвергать заморозке не позднее 2 ч после отбора [180], а фенольный глюкуронид эзетимиба остаётся стабильным в плазме в течение 8 ч хранения при комнатной температуре [89].

### Выводы по главе

1. Значения основных фармакокинетических параметров метилдопы после приёма таблеток в дозировке 250 мг, полученные в ходе сходных по дизайну исследований биоэквивалентности, отличаются, что может быть вызвано нестабильностью молекулы аналита в образцах плазмы.
2. Подходы к проведению фармакокинетических исследований мебеверина различаются: в одной из опубликованных работ определяют концентрации в плазме деметилированной мебевериновой кислоты, в другой – мебевериновой кислоты и мебеверинового спирта. В последней из публикаций авторы анализируют содержание всех трёх метаболитов.
3. Основными недостатками методик определения метаболитов мебеверина является длительная подготовка проб, время анализа и низкая чувствительность. Методики анализа метилдопы имеют аналогичные недостатки.
4. Опубликовано большое количество методик определения микофеноловой кислоты с применением методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС/МС в биологических жидкостях с применением разных способов пробоподготовки. Однако, результаты немногочисленных исследований обратной конверсии основных метаболитов данного соединения не совпадают.
5. Основной причиной окисления фенольных соединений в биологических жидкостях является взаимодействие со свободными радикалами, а также активными формами кислорода. На протекание процесса гидролиза глюкуронидов, главным образом, влияет рН среды. Для стабилизации образцов при биоаналитических исследованиях применяют определённые антикоагулянты и растворы стабилизаторов исходя из структурных особенностей определяемых веществ.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Дизайн исследования

Данное исследование включало в себя 2 экспериментальных этапа:

1. Разработка и валидация биоаналитических методик определения микофеноловой кислоты, метилдопы, деметилированной мебевериновой кислоты совместно с мебевериновой кислотой в плазме, а также осуществление перекрёстной валидации методик ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС-определения микофеноловой кислоты на образцах плазмы, полученных от нелинейных крыс.
2. Проведение исследований биоэквивалентности таблеток микофенолата натрия в дозировке 360 мг, метилдопы в дозировке 250 мг и изучение фармакокинетики капсул мебеверина в дозировке 200 мг.

Перед разработкой биоаналитических методик выбор аналитического диапазона осуществлялся на основании данных о значении максимальной концентрации исследуемого лекарственного средства или его метаболитов в плазме крови (мебеверин). Так, нижний предел количественного определения при проведении исследований БЭ должен быть не менее, чем 5% от  $C_{\max}$  [22, 24, 85, 87]. Условия подготовки проб в процессе разработки методики подбирались, исходя из требуемого уровня чувствительности: если при депротеинизации образца удаётся достигнуть требуемого значения НПКО и уровня селективности, то более трудоёмкие методы, таких как ЖЖЭ и ТФЭ [26, 40], не будут апробированы.

Этап разработки и валидации методики проходил заблаговременно до начала клинической части исследования. В случае фармакокинетических исследований лекарственных препаратов, имеющих потенциально нестабильные функциональные группы или образующих нестабильные метаболиты, данный этап является наиболее важным. После подбора условий хромато-масс-спектрометрического определения проводился подбор условий хранения образцов. При этом в качестве антикоагулянтов испытывались  $K_3$ ЭДТА (концентрация 1,2-2,0 мг/мл крови) и гепарин в форме литиевой соли (концентрация в плазме 12-30 МЕ на 1 мл крови), т.к. данные антикоагулянты являются самыми распространёнными при биоаналитических исследованиях. В случае наличия значимой обратной конверсии АГМФК перед выбором стабилизатора будут апробированы антикоагулянты, являющиеся ингибиторами эстераз, такие как натрия фторид и его комбинации с калия оксалатом и ЭДТА, т.к. в его структуре присутствует сложноэфирная

группа. Натрия цитрат в настоящее время практически не применяется при изучении фармакокинетики и биоэквивалентности, в т.ч. из-за сильного разведения образца [26, 118]. В случае неудовлетворительных результатов при предварительном изучении стабильности и обратной конверсии метаболитов будет выполнен подбор раствора стабилизатора.

После выбора антикоагулянта или комбинации антикоагулянта и раствора стабилизатора проводилась валидация (п. 2.4). По завершению данного этапа составлялись подробные инструкции для персонала клинического центра по приготовлению растворов стабилизаторов, использованию антикоагулянтов, условиям температурного режима при отборе, хранении и транспортировке биологических образцов [26, 40] (рис. 2.1). В случае методик ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС-определения микофеноловой проводилась перекрёстная валидация на образцах плазмы, полученных от 10 нелинейных крыс.



Рисунок 2.1. Дизайн исследований

После поступления образцов плазмы добровольцев, полученных в ходе клинического этапа запланированных исследований (п. 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3), в лабораторию осуществлялся их анализ. Затем производился расчёт фармакокинетических параметров изучаемых препаратов и их статистическая обработка.

## 2.2. Используемое оборудование, стандартные образцы и реактивы

ВЭЖХ-МС/МС-система, использованная для исследования фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением и микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой, а также перекрёстной валидации разработанных ГХ-МС и ВЭЖХ-МС-методик количественного определения микофеноловой кислоты включала трёхквадрупольный масс-спектрометрический детектор Thermo Scientific TSQ Quantum Discovery Max, оборудованный источником электрораспылительной ионизации с термофокусировкой (HESI), два насоса Flux Instruments 2200 Rheos, автосемплер CTC Analytics PAL HTS, десятипортовой переключающийся кран Alltech Select Pro. Управление прибором осуществлялась с помощью программного обеспечения Xcalibur 4.0.27, обработка результатов аналитических серий – с помощью LCQuan 2.9.

Для исследования биоэквивалентности таблетированных форм метилдопы применялась ВЭЖХ-МС/МС-система Shimadzu на базе хроматографа Prominence LC-20, включающая в себя два насоса LC-20AD со смешением 4 растворителей в области низкого давления, автосемплер SIL-20AC с устройством подачи проб Rack Changer II, термостат колонок CTO-20AC с интегрированным 6-портовым краном FCV-32AH и трёхквадрупольный масс-спектрометрический детектор LCMS-8050, оснащённый сдвоенной системой ионизации DUIS с возможностью одновременного применения электрораспылительной ионизации (ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Управление прибором и обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения Lab Solution 5.86. Автосемплер и устройство подачи проб данного прибора оснащены термостатом, позволяющим охлаждать подвергшиеся пробоподготовке образцы до температуры +4°C. Известно, что снижение температуры в устройстве для ввода проб замедляет процесс разложения всех классов нестабильных соединений и позволяет увеличить время их хранения [26, 40, 43, 58, 93, 118]. Поэтому эта конфигурация хромато-масс-спектрометра была выбрана для изучения сравнительной фармакокинетики препаратов метилдопы.

Разработка ВЭЖХ-МС-методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови была выполнена с помощью системы «Agilent 1260 Infinity», включающей в себя насос G1311C со смешением 4 растворителей в области низкого давления, автосемплер G1329B ALS, термостат колонок G1316A и моноквадрупольный масс-спектрометрический детектор 6130 Single quadrupole, оснащенный источником

электрораспылительной ионизации с термофокусировкой JetStream. Управление прибором и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью программного обеспечения OpenLab CDS ChemStation Edition A.06.32.

При разработке ГХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме крови использовалась система «Agilent», оснащённая газовым хроматографом Agilent 7890A с автосемплером 7693A ALS и моноквадрольным масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975C, управляемая программным обеспечением MSD ChemStation A.10.01.

Для пробоподготовки было использовано следующее оборудование:

- Весы Denver Instrument Company XE Series Model 100A (точность до 0,0001 г) (США)
- Вортекс-шейкер Elmi V-3 SkyLine (Латвия);
- Механические одноканальные дозаторы переменного объёма Sartorius Proline 20-200 мкл, 5-50 мкл, 100-1000 мкл (Финляндия);
- Центробежный вакуумный концентратор Eppendorf Concentrator Plus (Германия);
- Центрифуга Elmi CM 6M (Финляндия);
- Центрифуга Eppendorf 5810R с охлаждением (Германия);
- Системы очистки воды Merck Millipore Direct Q3 UV (Франция) и Sartorius Arium Comfort (Финляндия);
- рН-метр Portlab pH-102

В работе были использованы следующие реактивы:

- гелий для газовой хроматографии (чистота 99,999%, Центрогаз, Россия);
- ацетонитрил «HPLC-Grade» - Merck, Германия; Panreac Applichem, Испания;
- метанол «HPLC-Grade» - J.T.Baker (Avantor Performance Materials), Польша;
- раствор аммиака 25% «х.ч.» - Химмед, Россия;
- кислота муравьиная 85% «х.ч.» - Химмед, Россия;
- Натрия гидрофосфата додекагидрат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) «х.ч.» – «Химмед», Россия;
- Натрия дигидрофосфата дигидрат ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) «ч.д.а.» – «Химмед», Россия;
- Фосфорная кислота «ч.д.а.» - Химмед, Россия
- Смесь N,O- бис (триметилсилил) - трифторацетамида и триметилхлорсилана 99:1 (derivatизирующий агент)– Sigma Aldrich, Германия

В качестве стандартных образцов применялись следующие субстанции:

- Микофенолат натрия - Emcure Pharmaceuticals Limited, Индия (серия MYS30005, годен до 05.2016);
- Микофеноловая кислота –АО «Фармославль», Россия (серия 30717, годен до 07.2019)
- Дейтерированная микофеноловая кислота (-CD<sub>3</sub>) - TLC PharmaChem, Канада (серия 1475-039A2, годен до 06.2016);
- Фенольный глюкуронид микофеноловой кислоты - TLC PharmaChem, Канада (серия 1078-088A4, годен до 03.2016);
- Метилдопы сесквигидрат – Teva Pharmaceuticals, Израиль (серия 706500214, годен до 08.2018) ;
- Дейтерированная метилдопа (-CD<sub>3</sub>) - TLC PharmaChem, Канада (серия 1813-060A2, годен до 12.2017)
- Мебевериновая кислота – TRC, Канада (серия 4-MJS-55-1, годен до 05.2015);
- Дейтерированная мебевериновая кислота (-CD<sub>5</sub>) - TLC PharmaChem, Канада (серия 1778-089A1, годен до 11.2017);
- Деметилированная мебевериновая кислота – TRC, Канада (серия 1-NSM-108-1, годен до 05.2015);
- Дейтерированная деметилированная мебевериновая кислота (-CD<sub>5</sub>) - TLC PharmaChem, Канада (серия 1296-087A3, годен до 05.2018);
- Фенольный глюкуронид деметилированной мебеверинозой кислоты – TRC, Канада (серия 11-QFY-171-3, годен до 08.2018).

### **2.3. Приготовление калибровочных образцов и образцов контроля качества для проведения биоаналитических исследований**

Получение основных и рабочих растворов микофеноловой кислоты, метилдопы, мебеверинозой и деметилированной мебеверинозой кислот осуществлялось следующим образом:

*1). Приготовление основных и рабочих растворов для проведения биоаналитических исследований микофеноловой кислоты*

Точную навеску микофеноловой кислоты 0,1000 г или микофенолата натрия 0,1072 г переносили в мерную колбу объёмом 100 мл и доводили объём метанолом до метки (основной раствор). Для приготовления рабочих растворов аликвоты данного раствора переносили в мерные колбы определённого объёма и доводили объём метанолом

до метки. При этом концентрации рабочих растворов 20-кратно превосходили концентрации МФК в соответствующих калибровочных образцах и образцах контроля качества.

Для приготовления основного раствора внутреннего стандарта точную навеску МФК-D<sub>3</sub> 0,0100 г помещали в мерную колбу объёмом 10 мл и доводили объём до метки метанолом. Для получения рабочего раствора МФК-D<sub>3</sub> в концентрации 1,5 мкг/мл аликвоту 0,15 мл переносили в мерную колбу на 100 мл и доводили объём до метки метанолом.

При изготовлении основного раствора фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты точную навеску данного вещества 0,1000 г переносили в мерную колбу 50 мл и доводили объём до метки метанолом, затем 50 мкл данного раствора добавляли к 950 мкл плазмы, содержащей К<sub>3</sub>ЭДТА или гепаринат лития в качестве антикоагулянта, и полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек – концентрация ФГМФК в образцах составила 100 мкг/мл.

#### *2). Приготовление основных и рабочих растворов для проведения исследования биоэквивалентности метилдопы*

Приготовление основного раствора метилдопы осуществлялось путём растворения точной навески метилдопы сесквигидрата 0,0113 г в 0,1% растворе муравьиной кислоты в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Рабочие растворы готовились путём разведения определённого основного раствора метанолом в мерных колбах. При этом концентрации рабочих растворов 20-кратно превосходили концентрации аналита в соответствующих калибровочных образцах и образцах контроля качества.

Для приготовления основного раствора внутреннего стандарта точную навеску МД-D<sub>3</sub> 0,100 г помещали в мерную колбу объёмом 100 мл и доводили объём до метки метанолом. Для получения рабочего раствора МД-D<sub>3</sub> в концентрации 0,125 мкг/мл аликвоту 0,125 мл переносили в мерную колбу на 100 мл и доводили объём до метки метанолом.

#### *3). Приготовление основных и рабочих растворов для исследования фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением.*

Основные растворы мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот готовились отдельно путём растворения точных навесок 0,0100 г данных веществ в метаноле в мерных колбах на 100 мл. Приготовление рабочих растворов МК и ДМК осу-



ществлялось путём разведения равных аликвот основных растворов в мерных колбах. В каждом рабочем растворе присутствуют оба анализа в одинаковой концентрации, которая 20-кратно превышала их концентрацию в соответствующих образцах.

Приготовление основных растворов МК-D<sub>5</sub> и ДМК-D<sub>5</sub> осуществлялось по отдельности путём растворения точных навесок 0,0100 г в метаноле в мерной колбе на 100 мл. Затем из каждого основного раствора отбирали аликвоты объёмом 0,4 мл, переносили в мерную колбу на 100 мл и доводили объём до метки метанолом.

Основной раствор ФГДМК готовился путём растворения точной навески 0,1000 г в метаноле в мерной колбе на 100 мл. Аликвоту получившегося раствора объёмом 0,4 мл переносили в мерную колбу на 10 мл и доводили объём до метки метанолом. Затем 50 мкл данного раствора добавляли к 950 мкл плазмы, содержащей К<sub>3</sub>ЭДТА или гепаринат лития в качестве антикоагулянта, и полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек: концентрация ФГДМК в образцах составила - 2000 нг/мл.

#### *4). Изготовление калибровочных образцов и образцов контроля качества*

Холостые образцы плазмы были взяты у 6 здоровых добровольцев, которые за последние 2 недели до забора крови не принимали каких-либо лекарственных средств, витаминов, биологически активных добавок к пище, алкоголя. Образцы гемолизированной плазмы получали при центрифугировании крови при 6000 об/мин.

При проведении перекрёстной валидации методик определения микофеноловой кислоты использовалась К<sub>3</sub>ЭДТА-плазма крыс фирмы Innovative Grade US Origin Sprague Dawley (Rat Plasma IGRT-N 25 ml).

При изготовлении **калибровочных образцов и образцов контроля качества** аликвоту рабочих растворов объёмом 50 мкл добавляли к 950 мкл плазмы, содержащей К<sub>3</sub>ЭДТА в качестве антикоагулянта, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек.

При исследовании метилдопы образцы готовились следующим образом: к 950 мкл К<sub>3</sub>ЭДТА - плазмы добавляли 50 мкл соответствующего рабочего раствора и 200 мкл раствора стабилизатора, содержащего аскорбиновую кислоту в концентрации 50 мг/мл, натрию сульфит в концентрации 2 мг/мл и натрия гидрокарбонат в концентрации 24,0 мг/мл [4], затем полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек.

Для приготовления раствора стабилизатора точные навески 5,0 г аскорбиновой кислоты, 2,4 г натрия гидрокарбоната и 0,2 г натрия сульфита помещали в мерную колбу объёмом 100 мл и доводили объём водой до метки.

## 2.4. Порядок валидации разработанных методик

Основными нормативными документами, регламентирующими порядок валидации, являются руководства Европейского медицинского агентства (EMA) [87] и Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) по валидации биоаналитических методик [85], Руководство по экспертизе лекарственных средств НЦЭСМП (Том 1) [24] и Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [22]. При этом требования, приведенные в руководстве ЕАЭС [22] полностью совпадают с требованиями руководства EMA [87]. В руководстве НЦЭСМП [24] отсутствует отдельный перечень испытаний для методик с использованием методов связывания лиганда, но в отношении хроматографических методов анализа - правила идентичны с [87].

В нормативном документе FDA в списке валидационных параметров для хроматографических методик нет показателей «эффект матрицы» и «эффект переноса из предыдущей пробы», но присутствует показатель «степени извлечения» [85]. Также в данном руководстве нет критериев приемлемости для оценки селективности методики.

Степень извлечения рассчитывается путём сравнения отклика определяемого вещества, полученных после анализа извлечения из модельной смеси, с откликом аналита в чистом растворителе в такой же концентрации (с учётом разведения или концентрирования). Данный показатель рекомендуется оценивать на трёх уровнях концентраций, однако в большинстве случаев его рассчитывают совместно с показателем «Эффект матрицы» на двух уровнях концентраций [53, 70, 92, 105, 116, 123, 131, 145, 165].

Таким образом, исходя из требований перечисленных выше нормативных документов [22, 24, 85, 87] валидация разработанных методик будет проведена по показателям селективность, влияние переноса из предыдущей пробы, линейность калибровочной кривой, прецизионность и правильность внутри цикла и между циклами, отсутствие влияния разведения образцов, эффект матрицы (совместно со степенью извлечения), стабильность (табл. 2.1).

Объём валидационных испытаний и критерии их приемлемости [22, 24, 85, 87]

| Изучаемый параметр   | Объём проводимых испытаний  | Критерии приемлемости  |
|--|---|--|
| Селективность  | Анализируются 6 холостых образцов плазмы, полученных от разных доноров и 6 образцов НПКО  | S пиков в области времени удерживания аналита не превышает 20 % от S пика образца НПКО и 5 % от S пика ВС (сравниваются с образцами, приготовленными с применением данных холостых образцов)   |
| Линейность калибровочной кривой                            | Градуировочная зависимость содержит 8 калибровочных точек (для ВЭЖХ-МС и ГХ-МС методик определения МФК – 9 калибровочных точек из-за широкого аналитического диапазона методик)   | Полученные значения не менее 75 % концентраций должны быть в пределах $\pm 15$ % от номинальных значений, для нижнего предела количественного определения - в пределах $\pm 20$ %.   |
| Нижний предел количественного определения                  | Оценка проводится на 6 уровнях концентраций, включая НПКО. При этом анализируется 6 образцов одной концентрации. Всего проводится 3 цикла - не менее чем в 2 разных дня   | Среднее значение рассчитанных концентраций должно находиться в пределах $\pm 15$ % от номинальных значений для образцов КК, для НПКО - до $\pm 20$ % от номинальных значений. CV не должен превышать 15% для образцов контроля качества, для НПКО - не должно превышать 20%. При оценке межсерийной правильности и прецизионности рассчитывались средние значения концентраций и CV между всеми 3 циклами. |
| Внутрисерийная и межсерийная правильность и прецизионность |   |  |
| Влияние (эффект) переноса из предыдущей пробы              | Сравнение S пиков аналита и ВС на хроматограммах холостых образцов, полученных после анализа образцов ВПКО, с S пиков образца НПКО. Последовательность повторялась 3 раза: образец ВПКО → холостой образец → образец НПКО           | S пиков в области времени удерживания определяемого вещества после анализа образца ВПКО не превышает 20 % от S пика образца НПКО и 5 % от S пика ВС  |
| Отсутствие влияния разведения образцов                     | Двукратное разведение образцов с концентрацией аналита выше ВПКО холостой плазмой. Проводится 6 повторений.   | Значение рассчитанных концентраций должно находиться в пределах $\pm 15$ % от номинальных значений. CV не должен превышать 15%   |
| Матричные эффекты (степень извлечения)                     | S пиков аналита и ВС на хроматограммах 6 образцов КК (на 2 уровнях концентраций: LQC и HQC), приготовленных с использованием плазмы, полученной от разных добровольцев, сравниваются S пиков данных веществ в стандартных растворах | CV фактора матрицы (МФ) (при расчёте методом абсолютной калибровки) и нормализованного фактора матрицы (НМФ) (при использовании ВС) не должен превышать 15%  |

Изучение стабильности аналитов в биологических матрицах является одним из наиболее важных этапов валидации, особенно, при исследованиях веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы. В рамках данного показателя проводят испытания краткосрочной стабильности, долгосрочной стабильности, стабильности после нескольких циклов замораживания/размораживания, стабильности определяемых веществ в образцах, подвергшихся пробоподготовке (табл. 2.2).

Объем испытаний при изучении стабильности исследуемых веществ в плазме [22, 24, 85, 87]

| Параметр  | Условия проведения испытания   | Объем проводимых испытаний   | Критерии приемлемости  |
|---|--|--|--|
| Краткосрочная стабильность образцов                     | Хранение образцов при комнатной температуре в течение 24 ч   | Анализируют 6 образцов на 2 уровнях концентраций (LQC и HQC) сразу после приготовления и после окончания испытания | Средние значения концентраций должны находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений. |
| Долгосрочная стабильность образцов                      | Хранение образцов в морозильной камере при температуре не выше $-20^{\circ}\text{C}$ , (для метилдопы – также при температуре не выше $-80^{\circ}\text{C}$ ). Образцы анализируются спустя 1 мес хранения и спустя 3-4 мес хранения |  |  |
| Стабильность образцов при замораживании/ размораживании | Проводятся 3 цикла замораживания / размораживания, причём время заморозки образцов в каждом цикле - не менее 12 ч  |  |  |
| Стабильность подвергшихся прободготовке образцов        | Хранение обработанных образцов в устройстве для автоматического ввода пробы  |  |  |

Каждый аналитический цикл при проведении валидации методики, а также при анализе испытуемых образцов включал [22, 24, 85, 87]:

- холостой образец - подвергшийся обработке биологический образец, не содержащий анализируемого вещества и ВС (осаждение белков чистым растворителем);
- нулевой образец - подвергшийся обработке холостой образец с добавлением ВС (за исключением ВЭЖХ-МС и ГХ-МС-методик определения МФК) (осаждение белков раствором внутреннего стандарта);
- калибровочные образцы в 8 концентрациях (при ВЭЖХ-МС и ГХ-МС определении МФК – в 9 концентрациях);
- образцы контроля качества на 3 уровнях концентраций (нижний (LQC), средний (MQC) и верхний (HQC) уровни) в 2 повторностях, равномерно распределенные между испытуемыми образцами: образцы LQC - сразу после анализа калибровочных образцов, образцы MQC – после анализа половины испытуемых образцов, образцы HQC – в конце аналитического цикла.

При этом экспериментально рассчитанные концентрации не менее 6 калибровочных образцов должны находиться в пределах  $\pm 15\%$  от номинальных значений, для образцов НПКО - в пределах  $\pm 20\%$ . Полученные значения концентраций не менее чем 4 образцов контроля качества также должны быть в интервале  $\pm 15\%$  от номинальных

значений. При этом критериям приемлемости должен соответствовать результат, как минимум, одного образца КК на каждом уровне концентрации [22, 24, 85, 87].

Перекры́стная валидация методик определения микофеноловой кислоты проводилась согласно требованиям надлежащей лабораторной практики [21] на 10 нелинейных крысах-самцах массой  $250 \pm 10$  г, полученных из питомника Филиала Института биоорганической химии РАН. Субстанцию микофенолата натрия вводили крысам перорально в виде водного раствора в дозировке 33,0 мг/кг. Расчёт дозировки проводился по следующей формуле [6]:

$$\text{Доза для крысы} = \frac{\text{Доза МФК для человека} \times \text{КП для крысы}}{\text{Масса тела человека}}, \quad (\text{КП для крысы} = 6,0)$$

$$\text{Расчёт дозировки с пересчётом на МФН: } \frac{360 \text{ мг} \times 6,0}{70 \text{ кг}} \times \frac{342 \text{ г/моль}}{319 \text{ г/моль}} = 33,0 \text{ мг/кг}$$

Образцы крови забирались через 2 ч после приёма, т.к. согласно данным литературы этот момент соответствует времени достижения максимальной концентрации ФГМФК и АГМФК [121, 182]. После центрифугирования часть от каждого образца плазмы подвергалась немедленной пробоподготовке и анализировалась с применением разработанных методики, другая часть – замораживалась до температуры не выше  $-20^\circ\text{C}$  для последующего изучения обратной конверсии данных метаболитов в процессе хранения.

## 2.5. Дизайн фармакокинетических исследований

Изучение фармакокинетики мебеверина, и биоэквивалентности микофенолата натрия, метилдопы были выполнены на здоровых добровольцах европеоидной расы. Критерии включения и невключения в КИ (табл. 2.3) были установлены согласно методическим указаниям [23] и руководству ЕАЭС по проведению исследований биоэквивалентности [22]. При исследовании МФН дополнительным критерием невключения являлась врожденная недостаточность гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (в т.ч. при синдромах Леша-Найхана и Келли-Сигмиллера) [66].

Все КИ были выполнены согласно правилам надлежащей клинической практики [20], а также в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской Декларации [69]. Каждый доброволец после получения подробной информации о проводимом исследовании (цель исследования, фармакологический эффект, возможные нежелательные лекарственные реакции и другая информация об изучаемых ЛП, продол-

жительность исследования, условия проведения КИ и т.д. [22-24]) подписывал письменное информированное согласие.

Таблица 2.3

## Общие критерии включения и невключения в КИ

| Критерии включения   | Критерии невключения  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• возраст от 18 до 45 лет;</li> <li>• индекс массы тела от 18,5 до 30,0 кг/м<sup>2</sup>, при массе тела свыше 45 кг;</li> <li>• верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования;</li> <li>• для женщин – отрицательный тест на беременность и согласие придерживаться адекватных методов контрацепции (барьерные способы контрацепции; в случае использования гормональных контрацептивов, они должны быть отменены не менее, чем за 2 месяца до начала исследования)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• гиперчувствительность к действующему веществу или к другим компонентам изучаемого препарата;</li> <li>• отягощенный аллергологический анамнез;</li> <li>• острые и хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови;</li> <li>• участие в клиническом исследовании ЛП менее чем за 3 месяца до начала исследования;</li> <li>• беременность, кормление грудью;</li> <li>• прием веществ, существенно влияющих на активность микросомальных ферментов печени, гемодинамику и функцию пищеварительной системы за последние 2 месяца;</li> <li>• донорская сдача или потеря более 450 мл крови менее чем за 2 месяца до начала исследования;</li> <li>• прием любых ЛП менее чем за 2 недели до начала исследования</li> <li>• выявленные на скрининге отклонения от норм показателей клинических, инструментальных и лабораторных методов исследования;</li> <li>• курение более 10 сигарет в день;</li> <li>• острые инфекционные заболевания (грипп, ОРВИ) менее чем за 4 недели до включения в исследование;</li> <li>• хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте (за исключением аппендэктомии);</li> <li>• сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами в анамнезе;</li> <li>• врожденный дефицит лактазы, непереносимость лактозы, глюкозо-галактозная мальабсорбция<sup>1</sup></li> </ul> |

До приема ЛП проводился опрос добровольца о соблюдении требований подготовки к исследованию, физикальный осмотр, измерялись основные физиологические показатели (АД, ЧСС, ЧДД, температура тела). В ходе исследований также осуществлялся физикальный осмотр, измерение АД, ЧСС, ЧДД и температуры тела, а также сбор и регистрация нежелательных явлений. По завершении КИ были выполнены следующие лабораторные и инструментальные обследования: общий анализ мочи (цвет мочи, прозрачность, относительная плотность, рН мочи, белок в моче, глюкоза в моче, лейкоциты, эритроциты, эпителий, бактерии, кристаллы, слизь), анализ крови общий (гемоглобин, эритроциты, гематокрит, тромбоциты, лейкоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, лимфоциты, СОЭ) и биохимический (глюкоза, общий билирубин, креатинин, АСТ, АЛТ, ЩФ, общий белок), ЭКГ [22- 24].

<sup>1</sup>Все лекарственные формы содержат лактозу в качестве вспомогательного вещества

Во время проведения КИ применение других лекарственных препаратов не допускалось. В случае возникновения экстренной ситуации разрешалось использование любых ЛП, однако данный субъект выбывал из исследования.

Для каждого добровольца рассчитывались следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация ЛС в плазме крови ( $C_{max}$ ), время достижения максимальной концентрации ЛС в плазме крови ( $T_{max}$ ), площадь под фармакокинетической кривой, начиная момента приема препарата, до времени отбора последнего отбора крови, при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения ( $AUC_{0-t}$ ), площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ ), относительная скорость всасывания ( $C_{max}/AUC_{0-t}$ ), константа элиминации ( $k_{el}$ ), период полувыведения ЛС ( $T_{1/2}$ ), среднее время удержания ЛС в крови (среднее резидентное время (MRT)). Отношение значений  $AUC_{0-t}$  к  $AUC_{0-\infty}$  ( $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ ) должно превышать 80,0% для обеспечения достаточной длительности периода отбора образцов. В случае, если конечный моноэкспоненциальный участок фармакокинетической кривой добровольца содержал менее трёх точек со значениями концентрации равными или превышающими НПКО, осуществление процедуры нелинейного регрессионного анализа для вычисления константы элиминации и связанных с ней параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{1/2}$ , MRT не выполнялось [22, 26, 40].

Обработка статистических данных осуществлялась с помощью программ StatSoft STATISTICA v.10.0, пакета R, модуль Bear (Lee, Hsin-ya and Lee, Yung-jin, bear: Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability) и Microsoft Excel 2007.

При изучении сравнительной фармакокинетики статистические расчёты производились в порядке, изложенном в руководствах [22, 24, 86]. Заключение о биоэквивалентности выносилось по результатам сравнения отношений параметров  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $C_{max}/AUC_{0-t}$  тестируемого и референтного препаратов.

### ***2.5.1. Дизайн исследования биоэквивалентности микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой***

Подтверждение биоэквивалентности тестируемого препарата микофенолата натрия<sup>2</sup> в форме таблеток, покрытых оболочкой, в дозировке 360 мг референтному препарату «Майфортик» («Новартис», Швейцария; номер серии: S0347, дата: 12.2014) было

<sup>2</sup> Название и производитель тестируемого препарата не названы по требованию спонсора исследования

проведено на 48 здоровых добровольцах. Данное количество испытуемых выбрано исходя из высоких значений коэффициентов вариации фармакокинетических параметров МФК ( $CV > 30\%$ ) [23, 117, 183, 185]. В исследуемую популяцию вошли 34 женщины и 14 мужчин европеоидной расы в возрасте от 18 до 43 лет. Средний возраст испытуемых составил  $26,3 \pm 8,2$  лет, рост  $168,0 \pm 9,1$  см, вес  $61,8 \pm 9,0$  кг, ИМТ  $21,9 \pm 2,3$  кг/м<sup>2</sup> (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Демографические данные исследуемой популяции при изучении БЭ таблетированных форм микофенолата натрия

| №                  | ФИО | Пол | Возраст | Рост, см | Вес, кг | ИМТ  | №  | ФИО | Пол | Возраст | Рост, см | Вес, кг | ИМТ  |      |
|--------------------|-----|-----|---------|----------|---------|------|----|-----|-----|---------|----------|---------|------|------|
| 1                  | ЮАМ | Ж   | 20      | 167      | 67      | 24,0 | 25 | ЗМЮ | Ж   | 31      | 170      | 63      | 21,8 |      |
| 2                  | ОКЕ | Ж   | 22      | 152      | 50      | 21,6 | 26 | РИВ | М   | 24      | 171      | 64      | 21,9 |      |
| 3                  | РЖВ | Ж   | 42      | 164      | 64      | 23,8 | 27 | ЛСГ | Ж   | 31      | 164      | 60      | 22,3 |      |
| 4                  | МАС | Ж   | 21      | 165      | 60      | 22,0 | 28 | СМО | Ж   | 18      | 165      | 66      | 24,2 |      |
| 5                  | БАВ | Ж   | 18      | 169      | 56      | 19,6 | 29 | ШСА | М   | 21      | 178      | 78      | 24,6 |      |
| 6                  | МАБ | Ж   | 43      | 164      | 66      | 24,5 | 30 | СЮС | Ж   | 20      | 164      | 54      | 20,1 |      |
| 7                  | ЯВА | Ж   | 37      | 170      | 71      | 24,6 | 31 | КОА | Ж   | 32      | 165      | 66      | 24,2 |      |
| 8                  | РММ | Ж   | 18      | 163      | 51      | 19,2 | 32 | УИЮ | Ж   | 38      | 168      | 65      | 23,0 |      |
| 9                  | МИЕ | Ж   | 44      | 154      | 55      | 24,6 | 33 | АХР | Ж   | 21      | 158      | 50      | 20,0 |      |
| 10                 | СНН | Ж   | 44      | 160      | 63      | 24,6 | 34 | БЕП | Ж   | 24      | 164      | 64      | 23,8 |      |
| 11                 | БАЭ | Ж   | 26      | 160      | 58      | 22,7 | 35 | ХАА | Ж   | 21      | 169      | 53      | 18,6 |      |
| 12                 | ГЕН | Ж   | 42      | 165      | 53      | 19,5 | 36 | СРА | М   | 24      | 182      | 69      | 20,8 |      |
| 13                 | ПДД | Ж   | 20      | 172      | 57      | 19,3 | 37 | ММЧ | М   | 20      | 175      | 56      | 18,3 |      |
| 14                 | БАВ | М   | 34      | 174      | 74      | 24,5 | 38 | КЕС | Ж   | 22      | 173      | 73      | 24,4 |      |
| 15                 | КЕА | Ж   | 25      | 157      | 50      | 20,3 | 39 | ШВА | М   | 19      | 165      | 51      | 18,7 |      |
| 16                 | ЧСМ | М   | 24      | 167      | 57      | 20,4 | 40 | КНГ | Ж   | 23      | 157      | 58      | 23,5 |      |
| 17                 | ПНН | Ж   | 20      | 169      | 60      | 21,0 | 41 | ЯЭА | Ж   | 20      | 153      | 53      | 22,6 |      |
| 18                 | СЮС | Ж   | 20      | 168      | 55      | 19,5 | 42 | КЛН | Ж   | 22      | 151      | 50      | 21,9 |      |
| 19                 | ВАО | М   | 19      | 182      | 62      | 18,7 | 43 | АБВ | М   | 24      | 188      | 68      | 19,2 |      |
| 20                 | ЧАА | М   | 43      | 184      | 82      | 24,5 | 44 | КНМ | Ж   | 24      | 160      | 61      | 23,8 |      |
| 21                 | ЖСЕ | Ж   | 33      | 160      | 60      | 23,4 | 45 | РМА | М   | 25      | 185      | 64      | 18,7 |      |
| 22                 | ЛНВ | Ж   | 35      | 164      | 52      | 19,3 | 46 | ПЕГ | Ж   | 23      | 180      | 80      | 24,7 |      |
| 23                 | ДЮВ | М   | 27      | 179      | 79      | 24,6 | 47 | МВА | М   | 20      | 185      | 85      | 24,8 |      |
| 24                 | ИАИ | Ж   | 18      | 167      | 55      | 19,7 | 48 | РРР | М   | 20      | 176      | 58      | 18,7 |      |
| <b>Ср. знач.</b>   |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 26,3     | 168,0   | 61,8 | 21,9 |
| <b>SD</b>          |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 8,2      | 9,1     | 9,1  | 2,3  |
| <b>Мин. знач.</b>  |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 18       | 151     | 50   | 18,3 |
| <b>Макс. знач.</b> |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 44       | 188     | 85   | 24,8 |

Данное исследование по дизайну является открытым рандомизированным перекрестным. Добровольцы были рандомизированы методом генерации случайных чисел на 2 равные группы, одна из которых сначала принимала тестируемый препарат, затем референтный препарат (TR), другая - сначала принимала референтный препарат, затем тестируемый препарат (RT). План рандомизации представлен в таблице 2.5.

Согласно требованиям нормативной документации интервал времени между приемом лекарственных средств должен составлять не менее 5 - 6 периодов полувыведения



[22, 24, 86, 88]. Для микофеноловой кислоты значение  $T_{1/2}$  составляет в среднем 12 ч [102, 117], поэтому период отмывки должен быть не менее 72 ч. С учетом данных литературы [102, 117], а также с техническими возможностями клинического центра отмывочный период составил 14 дней.

Таблица 2.5

План рандомизации при исследовании биоэквивалентности микофенолата натрия

| Рандом. номер добр. | Период |   | Рандом. номер добр. | Период |   | Рандом. номер добр. | Период |   | Рандом. номер добр. | Период |   |
|---------------------|--------|---|---------------------|--------|---|---------------------|--------|---|---------------------|--------|---|
|                     | 1      | 2 |                     | 1      | 2 |                     | 1      | 2 |                     | 1      | 2 |
| 1                   | T      | R | 13                  | T      | R | 25                  | T      | R | 37                  | R      | T |
| 2                   | R      | T | 14                  | R      | T | 26                  | R      | T | 38                  | T      | R |
| 3                   | T      | R | 15                  | T      | R | 27                  | T      | R | 39                  | R      | T |
| 4                   | R      | T | 16                  | T      | R | 28                  | R      | T | 40                  | R      | T |
| 5                   | T      | R | 17                  | R      | T | 29                  | R      | T | 41                  | T      | R |
| 6                   | R      | T | 18                  | T      | R | 30                  | T      | R | 42                  | R      | T |
| 7                   | R      | T | 19                  | R      | T | 31                  | R      | T | 43                  | T      | R |
| 8                   | R      | T | 20                  | T      | R | 32                  | R      | T | 44                  | T      | R |
| 9                   | T      | R | 21                  | R      | T | 33                  | T      | R | 45                  | T      | R |
| 10                  | R      | T | 22                  | R      | T | 34                  | T      | R | 46                  | R      | T |
| 11                  | T      | R | 23                  | T      | R | 35                  | T      | R | 47                  | R      | T |
| 12                  | R      | T | 24                  | R      | T | 36                  | T      | R | 48                  | T      | R |

Испытуемым устанавливался кубитальный катетер на 12 ч, затем заборы крови выполнялись путем венепункции. Добровольцы принимали однократно натошак 1 таблетку исследуемого препарата, запивая 200 мл кипяченой воды. Стандартный завтрак испытуемые получали через 4 ч, обед - через 6 ч, ужин - через 10 ч после приема препарата. Выбор временных точек основан на данных литературы о величине времени достижения максимальной концентрации МФК [70, 102]: до приёма, через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч после приема ЛП.

### 2.5.2. Дизайн исследования биоэквивалентности метилдопы в форме таблеток

Для изучения биоэквивалентности метилдопы<sup>3</sup> в форме таблеток в дозировке 250 мг в качестве референтного препарата были выбраны таблетки «Допегит» в аналогичной дозировке (ЭГИС, Венгрия; серия D358N1014, срок годности: до 10.2019), т.к. данный препарат зарегистрирован в России и использовался в качестве препарата сравнения в аналогичных исследованиях [19, 138, 151]. В популяцию для оценки сравнительной фармакокинетики было включено 24 здоровых добровольца [41, 138, 151]: 12 женщин и 12 мужчин европеоидной расы в возрасте от 18 до 40 лет. Средний возраст испытуемых составил  $25,4 \pm 7,3$  лет, рост  $171,0 \pm 9,0$  см, вес  $65,8 \pm 7,2$  кг, ИМТ  $22,7 \pm 2,4$  кг/м<sup>2</sup> (табл. 2.6).

<sup>3</sup> Название и производитель тестируемого препарата не названы по требованию спонсора исследования

Таблица 2.6

## Демографические данные исследуемой популяции

| №                  | Пол | Возраст | Рост, см | Вес, кг | ИМТ  | №  | Пол  | Возраст | Рост, см | Вес, кг | ИМТ  |
|--------------------|-----|---------|----------|---------|------|----|------|---------|----------|---------|------|
| 1                  | Ж   | 32      | 158      | 66      | 26,4 | 13 | М    | 23      | 176      | 72      | 23,2 |
| 2                  | М   | 21      | 172      | 70      | 23,7 | 14 | Ж    | 40      | 165      | 57      | 20,5 |
| 3                  | М   | 25      | 175      | 75      | 24,5 | 15 | Ж    | 40      | 167      | 64      | 22,9 |
| 4                  | Ж   | 40      | 150      | 53      | 23,6 | 16 | Ж    | 24      | 160      | 58      | 22,7 |
| 5                  | М   | 19      | 167      | 65      | 23,3 | 17 | М    | 22      | 173      | 80      | 27,3 |
| 6                  | М   | 20      | 177      | 68      | 21,0 | 18 | Ж    | 19      | 165      | 57      | 20,9 |
| 7                  | М   | 19      | 192      | 78      | 21,2 | 19 | М    | 22      | 173      | 70      | 23,4 |
| 8                  | М   | 20      | 180      | 76      | 29,4 | 20 | М    | 22      | 175      | 63      | 20,5 |
| 9                  | Ж   | 26      | 167      | 59      | 21,2 | 21 | Ж    | 22      | 174      | 70      | 23,1 |
| 10                 | Ж   | 28      | 168      | 60      | 21,3 | 22 | М    | 23      | 178      | 60      | 18,9 |
| 11                 | Ж   | 28      | 165      | 59      | 21,6 | 23 | Ж    | 19      | 171      | 65      | 22,2 |
| 12                 | Ж   | 38      | 167      | 64      | 22,9 | 24 | М    | 18      | 188      | 70      | 19,8 |
| <b>Ср. знач.</b>   |     |         |          |         |      |    | 25,4 | 171,0   | 65,8     | 22,7    | 25,4 |
| <b>SD</b>          |     |         |          |         |      |    | 7,3  | 9,0     | 7,2      | 2,4     | 7,3  |
| <b>Мин. знач.</b>  |     |         |          |         |      |    | 18   | 150     | 53       | 18,9    | 18   |
| <b>Макс. знач.</b> |     |         |          |         |      |    | 40   | 192     | 80       | 29,4    | 40   |

По дизайну данное исследование является открытым рандомизированным перекрестным. Добровольцы были случайным образом распределены на 2 равные группы по 12 человек в связи с техническими возможностями клинического центра. Рандомизационный номер, присваиваемый методом генерации случайных чисел, определял последовательность приема тестируемого (Т) и референтного препаратов (R) в соответствии с планом рандомизации (табл. 2.7).

Таблица 2.7

## План рандомизации при исследовании биоэквивалентности метилдопы

| Рандом. номер добр. | Период |   | Рандом. номер добр. | Период |   | Рандом. номер добр. | Период |   | Рандом. номер добр. | Период |   |
|---------------------|--------|---|---------------------|--------|---|---------------------|--------|---|---------------------|--------|---|
|                     | 1      | 2 |                     | 1      | 2 |                     | 1      | 2 |                     | 1      | 2 |
| 1                   | T      | R | 7                   | R      | T | 13                  | T      | R | 19                  | T      | R |
| 2                   | R      | T | 8                   | R      | T | 14                  | R      | T | 20                  | R      | T |
| 3                   | T      | R | 9                   | T      | R | 15                  | T      | R | 21                  | R      | T |
| 4                   | R      | T | 10                  | R      | T | 16                  | T      | R | 22                  | T      | R |
| 5                   | T      | R | 11                  | T      | R | 17                  | R      | T | 23                  | R      | T |
| 6                   | R      | T | 12                  | R      | T | 18                  | T      | R | 24                  | T      | R |

Период полувыведения метилдопы составляет в среднем 3-4 ч [138, 151]. Поэтому интервал между приёмами изучаемых ЛП должен быть не менее 24 ч [22, 24]. С учетом данных литературы [138, 151], а также с техническими возможностями клинического центра отмывочный период составил 7 дней.

Добровольцы принимали однократно натошак 1 таблетку тестируемого или референтного препарата (в соответствии со схемой рандомизации), запивая 200 мл кипяченой воды. Первый приём пищи предлагался через 4 ч, обед - через 6 ч, ужин - через 10 ч после приема препаратов. Отбор проб крови осуществлялся через кубитальный катетер

до приёма препарата и через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1 ч 15 мин, 1,5 ч, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 15 мин, 2,5 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 9 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч после приёма [138].

### 2.5.3. Дизайн исследования фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением

Изучение фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением в дозировке 200 мг («Дюспаталин», производство «Эбботт Хелскеа САС» номер серии: 10215, годен до 04.17) было проведено на 24 здоровых добровольцах [179]. В популяцию для оценки фармакокинетических параметров было включено 13 женщин и 11 мужчин европеоидной расы в возрасте от 18 до 45 лет. Средний возраст добровольцев составил  $27,5 \pm 6,9$  лет, рост  $170,2 \pm 7,5$  см, вес  $67,0 \pm 11,8$  кг, ИМТ  $23,0 \pm 2,8$  кг/м<sup>2</sup> (табл. 2.8).

Таблица 2.8

Демографические данные исследуемой популяции

| №                  | ФИО | пол | Возраст | Рост, см | Вес, кг | ИМТ  | №  | ФИО | пол | Возраст | Рост, см | Вес, кг | ИМТ  |      |
|--------------------|-----|-----|---------|----------|---------|------|----|-----|-----|---------|----------|---------|------|------|
| 1                  | ММА | М   | 24      | 172      | 88      | 29,7 | 13 | ГНЕ | Ж   | 38      | 158      | 60      | 24,0 |      |
| 2                  | ПАА | Ж   | 21      | 166      | 55      | 20,0 | 14 | ММР | Ж   | 18      | 163      | 56      | 21,1 |      |
| 3                  | ИЮС | Ж   | 21      | 164      | 55      | 20,4 | 15 | ППА | Ж   | 21      | 165      | 60      | 22,0 |      |
| 4                  | КАС | М   | 27      | 185      | 90      | 26,3 | 16 | МСА | Ж   | 21      | 170      | 62      | 21,5 |      |
| 5                  | БНА | Ж   | 22      | 175      | 66      | 21,6 | 17 | КДА | Ж   | 25      | 167      | 61      | 21,9 |      |
| 6                  | ПТА | Ж   | 42      | 170      | 69      | 23,9 | 18 | ХГТ | Ж   | 26      | 165      | 65      | 23,9 |      |
| 7                  | КЕВ | Ж   | 20      | 168      | 57      | 20,2 | 19 | ТСВ | Ж   | 23      | 157      | 50      | 20,3 |      |
| 8                  | СДН | М   | 27      | 176      | 71      | 22,9 | 20 | РЭФ | Ж   | 23      | 164      | 66      | 24,5 |      |
| 9                  | ХАВ | М   | 39      | 167      | 70      | 25,1 | 21 | АРХ | М   | 19      | 175      | 68      | 22,2 |      |
| 10                 | БАВ | М   | 35      | 180      | 94      | 29,0 | 22 | ЗФФ | М   | 21      | 184      | 79      | 23,3 |      |
| 11                 | ФГМ | Ж   | 26      | 164      | 65      | 24,2 | 23 | ГГМ | М   | 21      | 176      | 60      | 19,4 |      |
| 12                 | ССВ | Ж   | 35      | 174      | 59      | 19,5 | 24 | ГИР | М   | 22      | 179      | 82      | 25,6 |      |
| <b>Ср. знач.</b>   |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 25,7     | 170,2   | 67,0 | 23,0 |
| <b>SD</b>          |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 6,9      | 7,5     | 11,8 | 2,8  |
| <b>Мин. знач.</b>  |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 18,0     | 157,0   | 50,0 | 19,4 |
| <b>Макс. знач.</b> |     |     |         |          |         |      |    |     |     |         | 42,0     | 185,0   | 94,0 | 29,7 |

Добровольцы принимали однократно натощак 1 капсулу исследуемого препарата, запивая 200 мл кипяченой воды. Стандартный завтрак испытуемые получали через 4 ч, обед - через 6 ч, ужин - через 10 ч после приема препарата. Отбор образцов крови осуществлялся через кубитальный катетер до приема препарата и через 30 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12ч, 24 ч после приема препарата [131, 179].

В данном исследовании производилось сравнение фармакокинетики мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот с целью оценки необходимости количественного определения МК в ходе изучения биоэквивалентности препаратов мебеверина. Различия между показателями в случае нормального распределения анализировались с применением параметрических методов (Т-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона), ненормального распределения - с применением непараметрических методов (Т-критерий Уилкоксона и рангового коэффициента корреляции Спирмена). Установление вида распределения выполнялось с помощью критерия Шапиро-Уилкса.

### **ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОФЕНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ, МЕТИЛДОПЫ И МЕТАБОЛИТОВ МЕБЕВЕРИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

Разработка методики определения исследуемых веществ в биологических объектах является важной частью фармакокинетических исследований. На данном этапе осуществляется подбор оптимальных условий подготовки проб и проведения анализов. При работе с соединениями, содержащими нестабильные функциональные группы, необходимо также выбрать способы предотвращения их разложения.

Валидация методики - обязательный этап биоаналитического исследования, требования к которому строго регламентированы российскими и международными руководствами [22, 24, 85, 87]. Целью данного этапа является гарантия получения точных и прецизионных результатов измерений посредством проведения испытаний на модельных смесях анализируемых веществ с изучаемыми биологическими жидкостями.

#### **3.1. Разработка методик количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови**

Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием наиболее часто использовалась при проведении биоаналитических исследований препаратов микофеноловой кислоты. Однако, существующие ВЭЖХ-МС/МС-методики имеют ряд недостатков (см. п. 1.1.3). Метод ВЭЖХ-МС никогда ранее не применялся для количественного определения данного соединения и его метаболитов в плазме и сыворотке крови, в отличие от ВЭЖХ-МС/МС. На настоящий момент в литературе также не были опубликованы методики анализа МФК, как в биологических жидкостях, так и в лекарственных формах с применением ГХ-МС. Этот метод является более селективным и чувствительным, чем ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ФД [5, 30]. Кроме того, при использовании ГХ-МС можно одновременно с определением МФК проводить скрининг на наличие в крови добровольца других лекарственных веществ, приём которых может повлиять на скорость процессов биотрансформации и экскреции и, тем самым, исказить результаты исследований БЭ [25, 39, 40].

### 3.1.1. Разработка методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Известно, что при использовании электрораспылительной ионизации фрагментация молекул в источнике ионов практически отсутствует [15, 16]. Так как МФК является органической кислотой, детектирование будет проводиться в режиме регистрации отрицательных ионов. Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектора проводилась путём непосредственного ввода раствора МФК в ацетонитриле в концентрации 0,1 мкг/мл в ионный источник с помощью шприцевого насоса. На рис. 3.1 представлен масс-спектр, получившийся в результате фрагментации молекулярного иона микофеноловой кислоты 319 m/z. Дочерний ион 205 m/z образуется в результате разрыва углеводородной цепи, а также отщепления метильной группы от метоксигруппы в бензольном кольце, дочерний ион 191 m/z – в результате последующего элиминирования метильной группы в бензольном кольце (рис. 3.2).

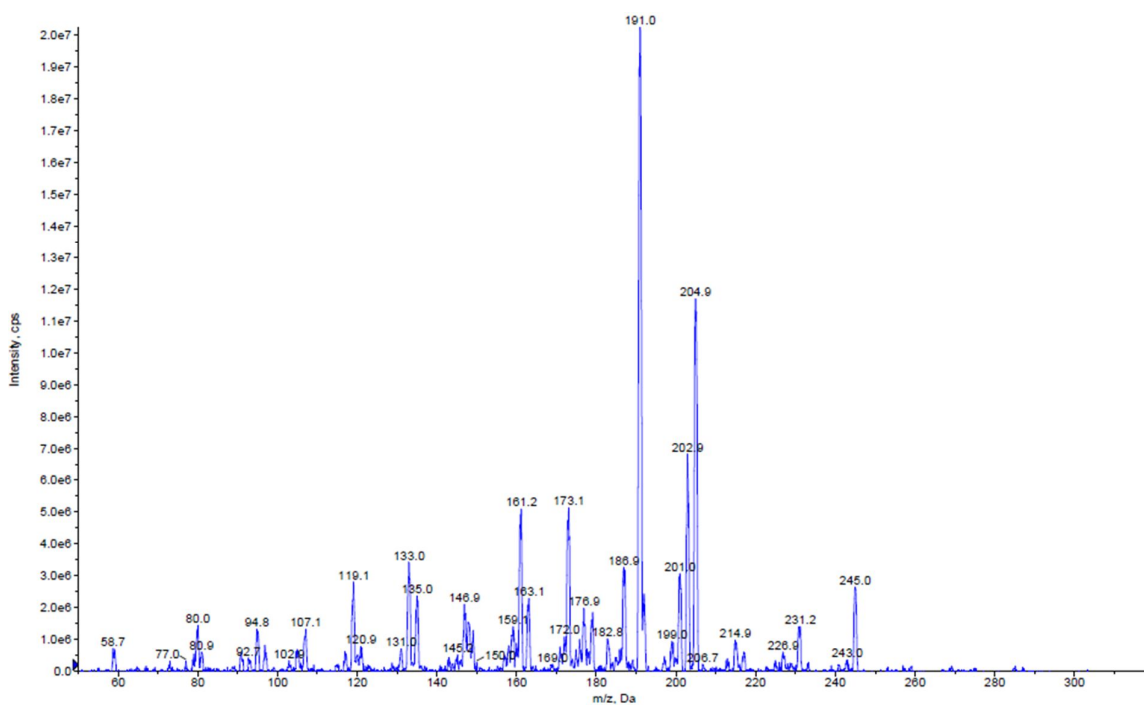


Рисунок 3.1. Масс-спектр молекулярного иона микофеноловой кислоты

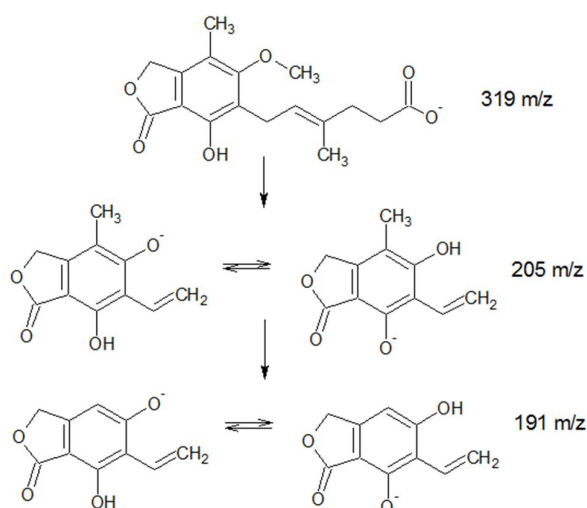


Рисунок 3.2. Схема фрагментации МФК

В результате фрагментации молекулярного иона дейтерированного внутреннего стандарта МФК (рис. 3.3) получается аналогичный масс-спектр.

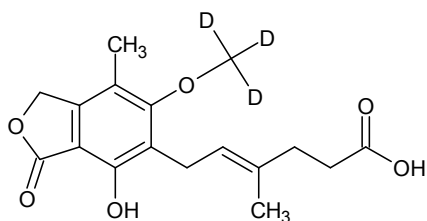


Рисунок 3.3. Структурная формула изотопно-меченного внутреннего стандарта микрофеноловой кислоты

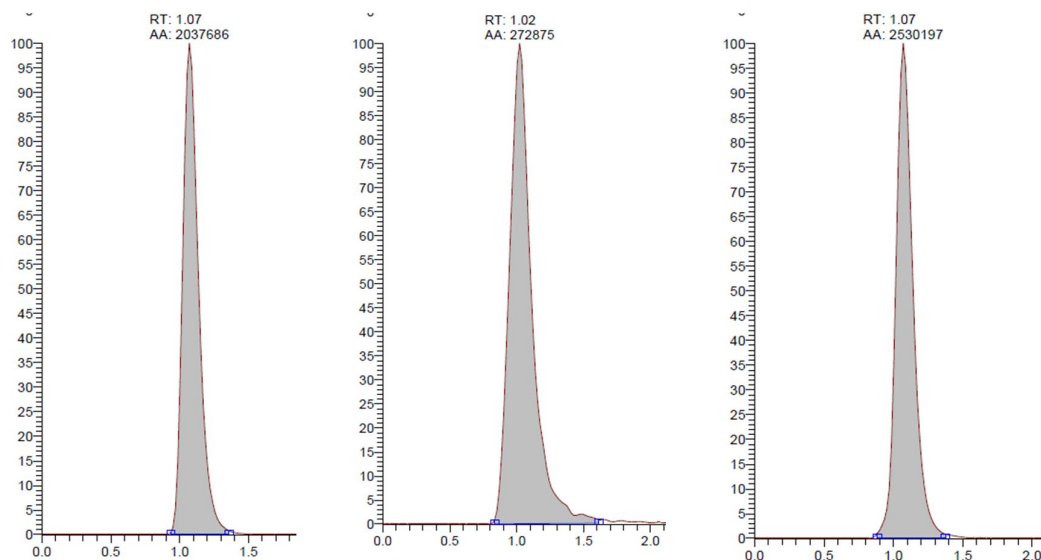
Для достижения наилучшей чувствительности масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось по двум MRM-переходам: для МФК - 319→191+205 *m/z*; для МФК-D<sub>3</sub> - 322→191+205 *m/z*. Выбранные в результате оптимизации параметры детектора приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Параметры масс-спектрометрического детектирования МФК и МФК-D<sub>3</sub>

| Параметр                          | Значение     |
|-----------------------------------|--------------|
| Напряжение электроспрея           | 3250 В       |
| Температура капилляра             | 222 °С       |
| Поток распыляющего газа           | 30 arb. unit |
| Поток фокусирующего газа          | 20 arb. unit |
| Поток вихревого газа              | 2 arb. unit  |
| Температура испарения             | 324 °С       |
| Давление газа в ячейке соударений | 1,5 мТорр    |

Для ВЭЖХ-МС/МС-определения МФК в плазме крови была выбрана колонка Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (30\*4,6 мм, 2,6 мкм) с предколонкой Phenomenex Security guard C18 (4\*3,0 мм, 5 мкм), т.к. неподвижные фазы на основе октадецилсиликигеля наиболее часто использовались для проведения биоаналитических исследований данного вещества [45, 50, 53, 56, 60, 65, 67, 70, 74, 76, 94, 115, 123, 128, 145, 149, 165, 174, 177, 178, 188]. Начальные условия хроматографического разделения были следующие: скорость потока - 0,4 мл/мин; объём вводимой пробы – 5 мкл; температура – комнатная; ПФ - ацетонитрил : вода в соотношении 65:35 (об./об.). Время удерживания ( $t_R$ ) аналита после анализа его ацетонитрильного раствора в концентрации 1 мкг/мл составило 1,07 мин (рис. 3.4 А). Далее был проанализирован раствор ФГМФК в ацетонитриле в концентрации 100 мкг/мл. Как видно из рис. 3.4, глюкуроновый конъюгат МФК подвергается фрагментации в источнике ионов и его  $t_R$  совпадает с  $t_R$  МФК. Таким образом, данные условия не позволяют хроматографически разделить анализируемое вещество и его основной метаболит.



|        | А       | Б      | В                 |
|--------|---------|--------|-------------------|
|        | МФК     | ФГМФК  | Смесь МФК и ФГМФК |
| S пика | 2037686 | 272875 | 2530197           |

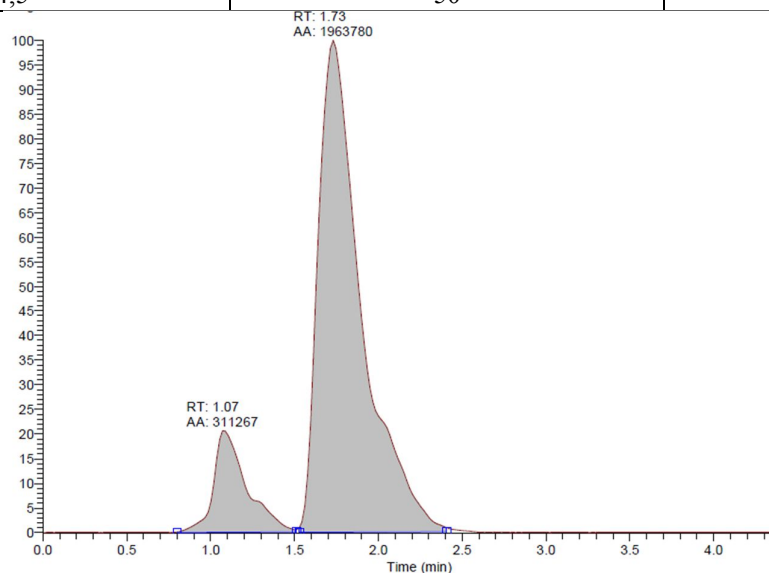
Рисунок 3.4 Хроматограммы растворов МФК (А), ФГМФК (Б) в ацетонитриле, смеси МФК и ФГМФК (В) при использовании ПФ: ацетонитрил : вода - 65:35 (об./об.)

Далее осуществлялся подбор условий градиентного элюирования с учётом обратной конверсии ФГМФК в источнике ионов. Начальные параметры градиентной программы (табл. 3.2) не позволили полностью отделить МФК и его метаболит (рис. 3.5).



## Программа градиентного элюирования №1

| Время, мин. | Ацетонитрил, % (об.) | Вода, % (об.) |
|-------------|----------------------|---------------|
| 0,0         | 50                   | 50            |
| 1,0         | 50                   | 50            |
| 1,5         | 65                   | 35            |
| 2,0         | 80                   | 20            |
| 2,5         | 80                   | 20            |
| 3,0         | 65                   | 35            |
| 3,5         | 50                   | 50            |
| 4,5         | 50                   | 50            |



|        | МФК     | ФГМФК  |
|--------|---------|--------|
| $t_R$  | 1,73    | 1,07   |
| S пика | 1963780 | 311267 |

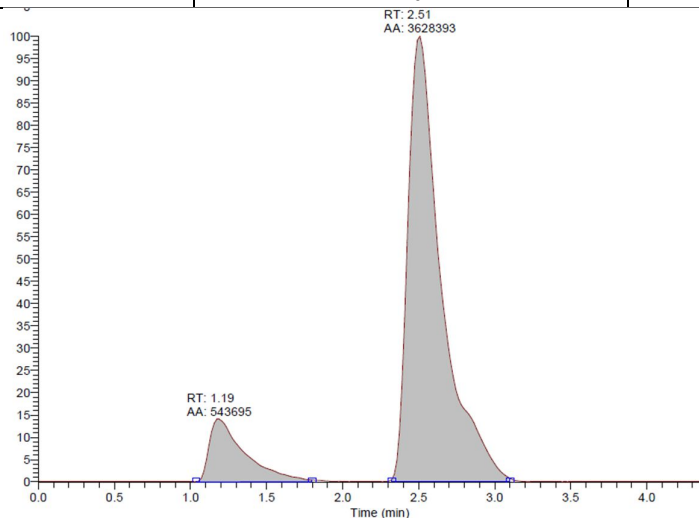
Рисунок 3.5. Хроматограмма смеси МФК и ФГМФК при использовании градиентной программы №1

После внесённых изменений (табл. 3.3) удалось достичь полного хроматографического разделения аналита и его основного метаболита и обеспечить тем самым требуемую селективность (рис. 3.6). Так, время удерживания ФГМФК составило 1,19 мин, а время удерживания МФК – 2,51 мин. Кроме того, использование данных параметров градиентного элюирования приблизительно в 1,8 раза повышало чувствительность разработанной методики (рис. 3.5, 3.6) [34, 36, 106, 108].

## Программа градиентного элюирования №2

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

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



|        | МФК     | ФГМФК  |
|--------|---------|--------|
| $t_R$  | 2,51    | 1,19   |
| S пика | 3628393 | 543695 |

Рисунок 3.6. Хроматограмма смеси МФК и ФГМФК при использовании градиентной программы №2

Таким образом, выбранные условия хроматографического разделения (табл. 3.3) позволяют полностью разделить исследуемое вещество и его основной метаболит.

Как известно, метод ВЭЖХ-МС/МС обладает высокой чувствительностью и селективностью, что позволяет определять низкие концентрации веществ в различных биологических матрицах [5, 15, 16, 25, 26, 40]. Поэтому в качестве метода подготовки проб было использовано осаждение белков. В результате были выбраны следующие условия: к 50 мкл плазмы добавляли 450 мкл раствора МФК-D<sub>3</sub> в концентрации 1,5 мкг/мл в метаноле, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин. Объем вводимой пробы (надосадочной жидкости) при этом составил 5 мкл [36, 106].

### 3.1.1.1. Предварительное изучение стабильности микофеноловой кислоты в плазме крови

Предварительное изучение стабильности микофеноловой кислоты в течение 24 ч хранения при комнатной температуре и 3 циклов замораживания/размораживания проводилось на образцах плазмы на уровне концентрации 25,0 мкг/мл с использованием

разных антикоагулянтов (К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития). Расчёт концентрации МФК на данном этапе осуществлялся методом внешнего стандарта (сравнение с площадью хроматографического пика свежеприготовленного образца). Результаты отвечают критериям приемлемости (табл. 3.4): полученные значения находятся в диапазоне от 85,0 до 115,0% от теоретической концентрации. Следовательно, данный анализ является стабильным, и добавления антиоксиданта не требуется.

Таблица 3.4

Результаты предварительной оценки стабильности МФК в плазме крови

| № п/п     | Краткосрочная стабильность (24 ч. при комнатной температуре), % от начальной концентрации |                 | Стабильность при замораживании/размораживании микофеноловой кислоты, % от начальной концентрации |                 |
|-----------|---|-----------------|--|-----------------|
|           | К <sub>3</sub> ЭДТА   | Гепаринат лития | К <sub>3</sub> ЭДТА  | Гепаринат лития |
| 1         | 101,1   | 98,3            | 99,2   | 103,2           |
| 2         | 95,1  | 104,2           | 102,6  | 92,8            |
| 3         | 103,2   | 100,7           | 100,1  | 95,5            |
| Ср. знач. | 99,8  | 101,1           | 100,6  | 97,2            |

*3.1.1.2. Изучение обратной конверсии фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты в процессе хранения образцов плазмы*

Изучение обратной конверсии ФГМФК проводилось на образцах плазмы, содержащих данный метаболит в концентрации 100 мкг/мл, что соответствует ожидаемым максимальным концентрациям данного метаболита в образцах от добровольцев [70, 75, 143]. При этом использовалась плазма с добавлением К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития в качестве антикоагулянтов. В процессе исследования из приготовленных модельных смесей отбирались аликвоты объёмом 50 мкл сразу после приготовления и через 24 ч после хранения при комнатной температуре для последующего анализа. Затем проводили сравнение площадей хроматографических пиков МФК, образовавшейся в результате гидролиза ФГМФК, с площадью хроматографических пиков МФК на уровне концентраций 0,5 мкг/мл (табл. 3.5) [36, 106, 108].

Таблица 3.5

Влияние антикоагулянтов на процесс обратной конверсии фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты

|  | Антикоагулянт       |                 |
|--|---------------------|-----------------|
|  | К <sub>3</sub> ЭДТА | Гепаринат лития |
| Средняя площадь хром. пика МФК в образце 0,5 мкг/мл (n=6)  | 56466,28            | 51567,88        |
| Начальное значение площади хром. пика МФК в образце ФГМФК (n=6)                                  | 0                   | 0               |
| Значение площадь хром. пика МФК в образце ФГМФК после 24 ч. хранения при комн. температуре (n=6) | 1456,83             | 3837,50         |
| % от площади хром. пика МФК образца 0,5 мкг/мл (НПКО)  | 2,58                | 7,44            |

Таким образом, при использовании обоих антикоагулянтов уровень обратной конверсии ФГМФК оставался на допустимом уровне: не более 20% от площади хроматографического пика образца НПКО. Для дальнейшего исследования в качестве антикоагулянта был выбран  $K_3$ ЭДТА, т.к. относительное количество гидролизованного метаболита после 24 ч хранения при комнатной температуре составило 2,58% от площади хроматографического пика образца НПКО, что в 3 раза меньше, чем при использовании гепарината лития.

### 3.1.1.3. Валидация ВЭЖХ-МС/МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме

Для проведения исследования был выбран аналитический диапазон 0,5 - 30,0 мкг/мл. Калибровочные кривые содержали 8 калибровочных концентраций: 0,50, 1,00, 4,00, 8,00, 12,00, 18,00, 24,00, 30,00 мкг/мл. Подтверждение внутрисерийной и межсерийной прецизионности и правильности выполнялось на шести уровнях концентраций: 0,50, 1,50, 5,00, 15,00, 22,50, 30,00 мкг/мл. Результаты валидации методики представлены в табл. 3.6 [34, 36, 106, 108].

Таблица 3.6

Результаты валидации ВЭЖХ-МС/МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме

| Параметр                                    |   | Результат  |       |      |       |       |       |
|---|---|--|-------|------|-------|-------|-------|
| Селективность                               |   | Хроматографические пики в области времени удерживания определяемого вещества и ВС на хроматограммах холостых образцов отсутствовали (рис. 3.8)   |       |      |       |       |       |
| Калибровочная кривая                        |   | Линейная зависимость, полученная с помощью взвешенного метода наименьших квадратов (рис.3.7, Прил.1, табл. 1): уравнение $y = a \cdot x + b$ , где:<br>$x$ – концентрация МФК в плазме, мкг/мл;<br>$y$ – соотношение площадей хроматографических пиков «МФК/МФК-D <sub>3</sub> »<br>$a$ – угловой коэффициент<br>$b$ – свободный член<br>Весовой коэффициент - $1/x$ |       |      |       |       |       |
| Концентрация, мкг/мл                        |   | 0,50   | 1,50  | 5,00 | 15,00 | 22,50 | 30,00 |
| Внутрисерийная правильность (отн. погр., %) | 1 | 8,62   | 11,38 | 6,67 | 12,85 | 7,96  | 6,37  |
|   | 2 | 2,41   | 0,59  | 2,07 | 0,25  | 2,37  | 6,44  |
|   | 3 | -3,00  | 1,44  | 2,77 | -4,03 | 0,24  | -0,65 |

| Параметр   |   | Результат                            |      |  |      |      |       |
|--|---|--------------------------------------|------|--|------|------|-------|
| Межсерийная правильность (n=18)<br>(отн. погр., %) |   | 2,78                                 | 4,04 | 3,83   | 3,03 | 1,95 | -0,24 |
| Внутрисерийная прецизионность (CV, %)              | 1 | 4,42                                 | 4,62 | 2,54   | 4,36 | 4,01 | 4,52  |
|  | 2 | 4,23                                 | 8,52 | 1,72   | 4,84 | 4,65 | 7,05  |
|  | 3 | 6,22                                 | 4,47 | 4,11   | 8,12 | 6,07 | 4,93  |
| Межсерийная прецизионность (CV, %)                 |   | 6,75                                 | 7,63 | 3,42   | 9,01 | 6,42 | 7,48  |
| Эффект переноса из предыдущей пробы                |   | Отсутствует                          |      |  |      |      |       |
| Эффект разведения (n=6)                            |   | Образец с концентрацией 45,00 мкг/мл |      | Среднее значение относительной погрешности = 0,16%, CV = 4,46% |      |      |       |
| Эффект матрицы (CV NMF)                            |   | LQC (1,50 мкг/мл)                    |      | 7,46%  |      |      |       |
|  |   | HQC (22,50 мкг/мл)                   |      | 6,55%  |      |      |       |
| Степень извлечения (MF)                            |   | LQC (1,50 мкг/мл)                    |      | 89,53% (CV=11,75 %)  |      |      |       |
|  |   | HQC (22,50 мкг/мл)                   |      | 87,80% (CV=7,17%)  |      |      |       |

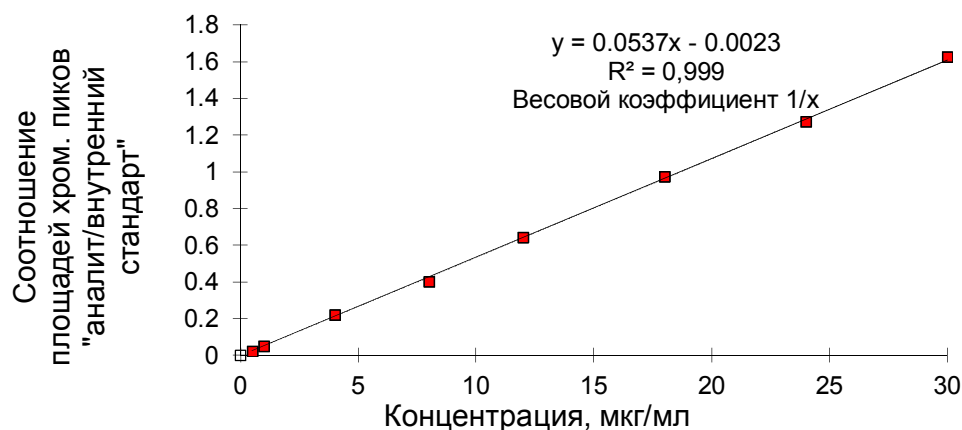
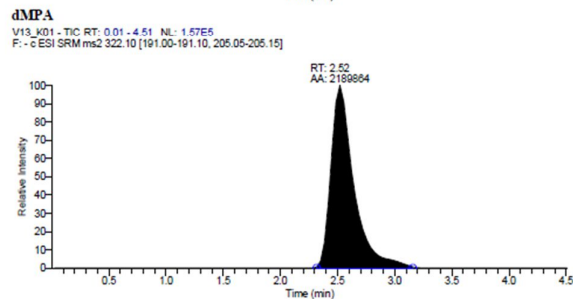
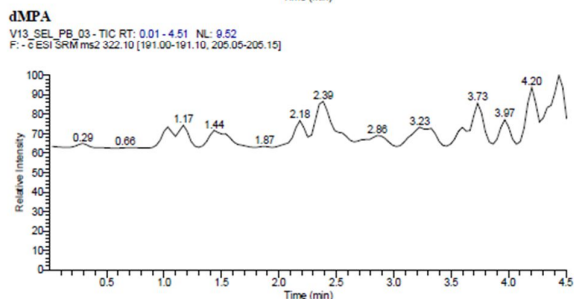
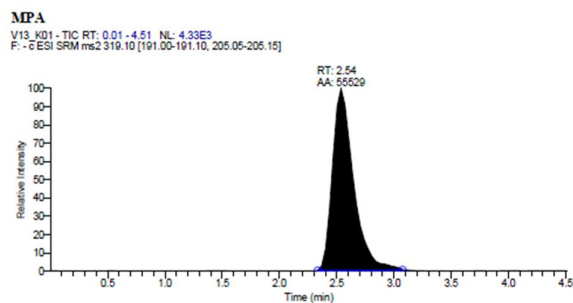
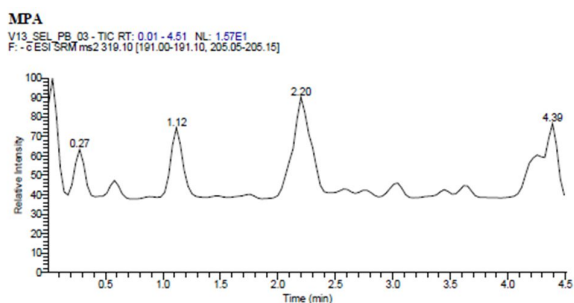


Рисунок 3.7. Пример калибровочной кривой при определении МФК методом ВЭЖХ-МС/МС

Краткосрочная стабильность при комнатной температуре, стабильность в течение 3 циклов замораживания/размораживания, стабильность обработанных образцов в автосемплере, долгосрочная стабильность оценивались на 2 уровнях концентраций: 1,5 мкг/мл (LQC), 22,5 мкг/мл (HQC). При этом МФК в образцах плазмы оставалась стабильной (Прил. 2, табл. 1): относительное содержание аналита находилось в диапазоне 85,00% до 115,00% от номинальной концентрации. Выбранный режим заморозки до температуры не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  обеспечивает сохранность образцов в течение 4 мес.

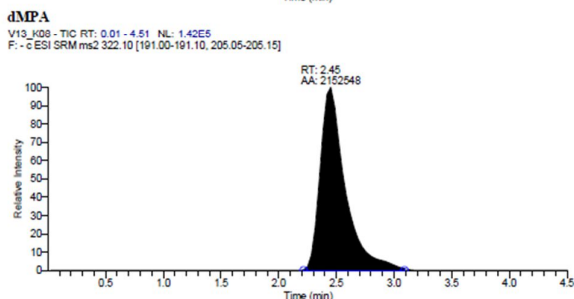
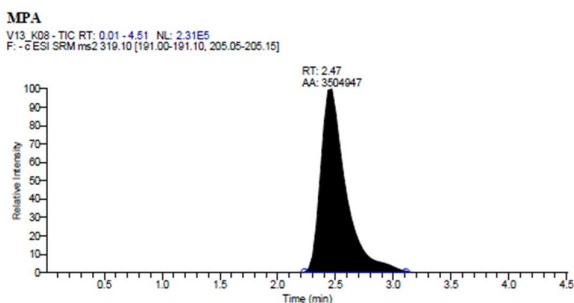


| Component Name | Integration Type | Area | ISTD Area | Response Ratio | Calculated Conc |
|----------------|------------------|------|-----------|----------------|-----------------|
| MPA            | Method Settings  | N/A  | N/A       | N/A            | NC              |

| Component Name | Integration Type | Area  | ISTD Area | Response Ratio | Calculated Conc |
|----------------|------------------|-------|-----------|----------------|-----------------|
| MPA            | Method Settings  | 55529 | 2189864   | 0.025357       | 0.52            |

А

Б



| Component Name | Integration Type | Area    | ISTD Area | Response Ratio | Calculated Conc |
|----------------|------------------|---------|-----------|----------------|-----------------|
| MPA            | Method Settings  | 3504947 | 2152548   | 1.628278       | 30.37           |

В

MPA – хроматограмма микофеноловой кислоты (319→191+205 m/z); dMPA – хроматограмма внутреннего стандарта (321→191+205 m/z)

Рисунок 3.8. Пример хроматограммы холостого образца (А) и образца МФК в концентрации 0,5 мкг/мл (Б) и 30 мкг/мл (В).

Таким образом, разработанная методика определения МФК с применением ВЭЖХ-МС/МС соответствует требованиям, установленным руководствами по валида-

ции биоаналитических методик [22, 24, 85, 87]. Данный аналит, содержащий в своей структуре один фенольный гидроксил, оставался стабильным в образцах  $K_3$ ЭДТА-плазмы в течение 4 мес хранения при температуре не выше  $-20^{\circ}C$ . Обратная конверсия ФГМФК находилась в допустимых пределах. Поэтому добавления к плазме каких-либо растворов стабилизаторов не требуется.

### 3.1.2. Разработка методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ВЭЖХ-МС

Детектирование микофеноловой кислоты проводилось по молекулярному иону 319 m/z. Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектора проводилась путём анализа раствора данного аналита в ацетонитриле в концентрации 0,1 мкг/мл в режиме FIA (Flow Injection Analysis – ввод пробы через автосемплер при потоке элюента в масс-спектрометрический детектор без хроматографической колонки). Выбранные в результате условия детектирования приведены в табл. 3.7.

Таблица 3.7

Параметры масс-спектрометрического детектирования МФК методом ВЭЖХ-МС

| Параметр                           | Значение       |
|------------------------------------|----------------|
| Напряжение электроспрея            | -3250 В        |
| Напряжение на фрагменторе          | -70 В          |
| Скорость потока осушающего газа    | 13 л/мин       |
| Скорость потока фокусирующего газа | 12 л/мин       |
| Температура фокусирующего газа     | $360^{\circ}C$ |
| Температура осушающего газа        | $350^{\circ}C$ |

Для обеспечения возможности детектирования следовых количеств микофеноловой кислоты при проведении фармакокинетических исследований НПКО данной методики был снижен до 0,05 мкг/мл [34, 39]. Использованные в ВЭЖХ-МС/МС - методе параметры хроматографического разделения (табл. 3.2) и осаждение белков плазмы метанолом в соотношении 1:4 «плазма/осадитель» не позволили достичь данного уровня чувствительности (рис. 3.9).

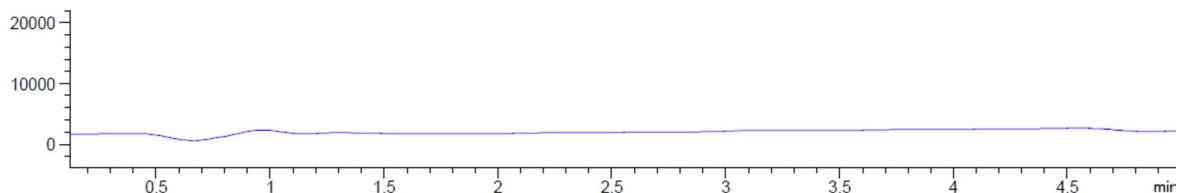


Рисунок 3.9. Хроматограмма образца МФК с концентрацией 0,05 мкг/мл при использовании параметров хроматографического разделения ВЭЖХ-МС/МС-метода

Для разработки ВЭЖХ-МС-методики определения МФК в плазме крови была выбрана колонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (100\*4,6мм, 3,5 мкм) также на основе октадецилсиликигеля. Начальные условия хроматографического разделения были следующие: скорость потока - 0,6 мл/мин; температура термостата - 40°C; объём вводимой пробы – 1 мкл; ПФ - ацетонитрил : вода в соотношении 50:50 (об./об.). Как видно из рис. 3.10, аналит практически не удерживается при данных условиях хроматографического разделения, его  $t_R$  составило – 1,323 мин.

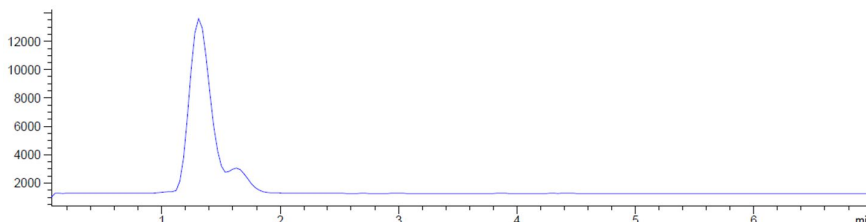


Рисунок 3.10. Хроматограмма раствора МФК в ацетонитриле 1 мкг/мл – ПФ: ацетонитрил : вода -50:50 (об./об.)

При увеличении количества воды в составе ПФ (ацетонитрил : вода - 35:65 (об./об.))  $t_R$  МФК незначительно возросло до 1,800 мин, а также наблюдалось раздвоение хроматографического пика (рис. 3.11), что свидетельствует об одновременном присутствии молекулярной и ионизированной формы МФК.

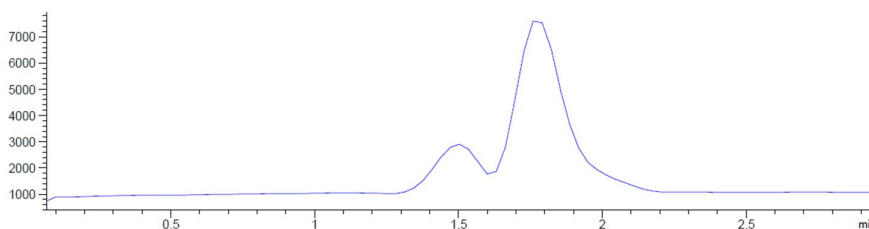


Рисунок 3.11. Хроматограмма раствора МФК в ацетонитриле 1 мкг/мл – ПФ: ацетонитрил : вода -35:65 (об./об.)

При включении состав элюента 0,1% раствора муравьиной кислоты (ацетонитрил : вода : 0,1% раствор муравьиной кислоты - 50:45:5 (об./об./об.)) повысило удерживание определяемого вещества ( $t_R$  МФК = 3,707 мин, площадь хроматографического пика – 507842 ЕД\*с) за счёт его перевода в молекулярную форму (рис. 3.12). Использование раствора формиата аммония рН = 2,5 в концентрации 20 ммоль/л (ацетонитрил : раствор формиат аммония рН = 2,5 - 50:50 (об./об.)) и раствора муравьиной кислоты 0,1% (ацетонитрил : раствор муравьиной кислоты 0,1% - 50:50 (об./об.)) не изменяло  $t_R$  МФК, однако, приводило снижению чувствительности в 5 раз (площади хроматографических пиков МФК – 102589 ЕД\*с и 125896 ЕД\*с, соответственно).



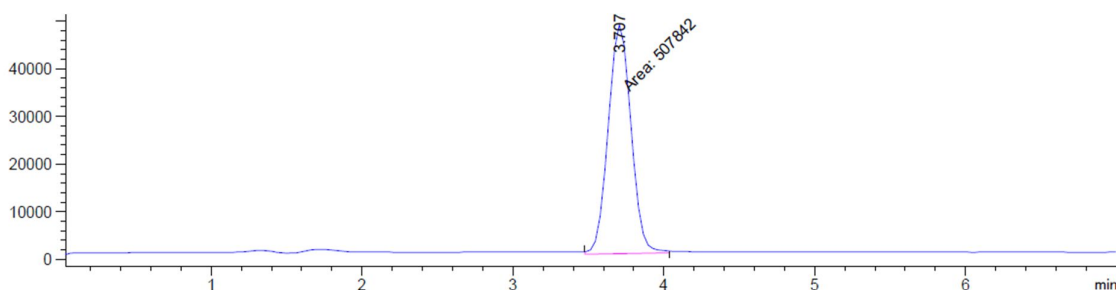


Рисунок 3.12. Хроматограмма раствора МФК в ацетонитриле 1 мкг/мл – ПФ: ацетонитрил : вода : 0,1% раствор муравьиной кислоты - 50:45:5 (об./об./об.)

Таким образом, изократический режим элюирования с применением ПФ на основе ацетонитрила, воды и 0,1% раствора муравьиной кислоты в соотношении 50:45:5 (об./об./об.) является оптимальным для анализа МФК при скорости потока 0,6 мл/мин и температуре термостата 40°C. Данные условия позволяют полностью хроматографически разделить аналит и его основной метаболит ФГМФК (рис. 3.13).

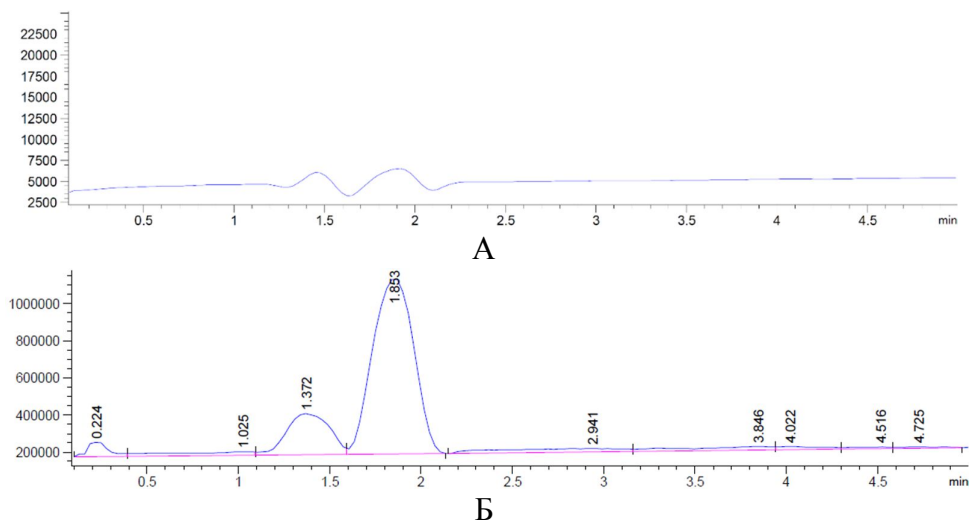


Рисунок 3.13. Хроматограмма раствора ФГМФК в ацетонитриле в концентрации 100 мкг/мл: А– Режим SIM – 319 m/z; Б - Режим Scan - 50-550 m/z (полярность – отрицательная)

Для пробоподготовки был использован наиболее простой и экспрессный метод - осаждение белков. При применении ВЭЖХ-МС для анализа проб данный метод используется достаточно часто [18]. Таким образом, оптимальными условиями подготовки образцов является следующие: к 50 мкл плазмы добавляли 200 мкл метанола, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек и центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин. Затем 5 мкл надосадочной жидкости вводили в хроматографическую систему [107, 108].

3.1.2.1. Исследование обратной конверсии глюкуронидов микофеноловой кислоты в процессе хранения при значении НПКО методики 0,05 мкг/мл

Оценка обратной конверсии ФГМФК также проводилось на образцах плазмы, содержащих данное соединение в концентрации 100 мкг/мл, при использовании К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития в качестве антикоагулянтов. При этом из данных проб через определённые промежутки времени хранения при комнатной температуре отбирались аликваты объёмом 50 мкл для последующего хромато-масс-спектрометрического определения. Затем проводили сравнение площадей хроматографических пиков МФК, которая образовывалась в результате гидролиза ФГМФК, с площадью хроматографических пиков МФК на уровне концентраций 0,05 мкг/мл. Уровень обратной конверсии основного метаболита МФК при применении антикоагулянта К<sub>3</sub>ЭДТА не превышал максимально допустимого уровня (не выше 20% от площади хроматографического пика образца МФК с концентрацией 0,05 мкг/мл (НПКО)) в течение 6 ч. Образцы, стабилизированные гепаринатом лития, можно хранить при комнатной температуре не более 2 ч, что значительно меньше, чем при использовании К<sub>3</sub>ЭДТА (табл. 3.8). Поэтому при проведении биоаналитических исследований микофеноловой кислоты следует применять К<sub>3</sub>ЭДТА [107, 108].

Таблица 3.8

Влияния антикоагулянтов на процесс обратной конверсии фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты при значении НПКО методики 0,05 мкг/мл

|                          | Образец МФК с концентрацией 0,05 мкг/мл | Образец ФГМФК с концентрацией 100 мкг/мл |       |        |        |        |        |        |         |
|--------------------------|---|--|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
|                          |   | Нач.                                     | 1 ч   | 2 ч    | 3 ч    | 4 ч    | 6 ч    | 8 ч    | 24 ч    |
| К <sub>3</sub> ЭДТА      |   |  |       |        |        |        |        |        |         |
| Сред. S пика МФК (n=3)   | 8073,5                                  | -  | 339,6 | 485,3  | 520,4  | 1077,8 | 1374,7 | 1801,0 | 3632,7  |
| % от S пика образца НПКО | -                                       | -  | 4,2   | 6,0    | 6,4    | 13,3   | 17,0   | 22,3   | 45,2    |
| Гепаринат лития          |   |  |       |        |        |        |        |        |         |
| Сред. S пика МФК (n=3)   | 6512,0                                  | -  | 523,0 | 1204,2 | 1556,0 | 3568,5 | 4899,0 | 7851,4 | 10045,0 |
| % от S пика образца НПКО | -                                       | -  | 8,0   | 18,5   | 23,9   | 54,8   | 75,2   | 120,6  | 154,3   |

Далее проводилось изучение стабильности ФГМФК в К<sub>3</sub>ЭДТА-плазме в течение 3 циклов заморозки/разморозки, в депротеинизате образцов плазмы при хранении в автосемплере в течение 24 ч, а также долгосрочная стабильность при температуре не выше -20<sup>0</sup>С в течение 1 мес. Концентрация метаболита в образцах также составила 100 мкг/мл. В результате гидролиз ФГМФК полностью отсутствовал (табл. 3.9).

Таблица 3.9

## Оценка обратной конверсии ФГМФК в плазме при хранении

|  | Средняя S пика МФК (n=6) |                   | % от S пика образца НПКО |                   |
|--|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
|  | Начальное значение       | Конечное значение | Начальное значение       | Конечное значение |
| Хранение образцов с ФГМФК при температуре не выше -20 °С в течение 1 мес.*   | -                        | -                 | 0                        | 0                 |
| Стабильность ФГМФК в депротеинизате образцов плазмы при хранении в автосемплере в течение 24 ч.  | -                        | -                 | 0                        | 0                 |
| Стабильность в течение 3 циклов заморозки/разморозки   | -                        | -                 | 0                        | 0                 |
| * данное испытание проводилось перед изучение обратной конверсии на образцах, полученных от крыс, чтобы выяснить, какой вклад вносит гидролиз ФГМФК в результаты испытания |                          |                   |                          |                   |

Для изучения обратной конверсии метаболитов ФГМФК и АГМФК в процессе хранения образцы, полученные от нелинейных крыс, были проанализированы через 1 мес после отбора.

Таблица 3.10

## Результаты повторного анализа испытуемых образцов

| № образца | Начальные результаты измерений | Конечные результаты измерений | Различие, % |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------|-------------|
| 1         | 9,35                           | 9,95                          | 6,47        |
| 2         | 8,96                           | 8,76                          | -2,27       |
| 3         | 5,18                           | 5,67                          | 9,49        |
| 4         | 9,66                           | 10,08                         | 4,30        |
| 5         | 12,31                          | 12,42                         | 0,89        |
| 6         | 9,01                           | 8,93                          | -0,83       |
| 7         | 4,95                           | 4,78                          | -3,43       |
| 8         | 21,40                          | 20,71                         | -3,26       |
| 9         | 9,65                           | 9,52                          | -1,33       |
| 10        | 7,89                           | 7,98                          | 1,13        |
|           |                                | Сред. знач.                   | 1,12        |
|           |                                | Мин. знач.                    | -3,43       |
|           |                                | Макс. знач.                   | 9,49        |

Как видно из данных, приведённых в табл. 3.10, различие между начальным и конечным результатами измерений не превышает 20%, во всех случаях, что отвечает критериям приемлемости [22, 24, 85, 87]. Таким образом, выбранные условия хранения позволили сохранить уровень обратной конверсии ФГМФК и АГМФК на допустимом уровне и добавление раствора стабилизатора для предотвращения гидролиза ацилглюкуронида микофеноловой кислоты не требуется.

Таким образом, в случае выбора уровня НПКО методики определения МФК 0,05 мкг/мл образцы плазмы, стабилизированной К<sub>3</sub>ЭДТА, следует хранить при комнатной температуре не дольше 6 ч из-за обратной конверсии ФГМФК. При заморозке до температуры не выше -20°С в течение 1 мес, в течение 3 циклов заморозки/разморозки, а

также депротеинизата плазмы в условиях автоматического пробоотборника разложения данного метаболита не наблюдалось.

### 3.1.2.2. Валидация ВЭЖХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме

Аналитический диапазон данной методики составил 0,05 - 30,0 мкг/мл. Калибровочные кривые содержали 9 калибровочных концентраций: 0,05, 0,10, 0,25, 1,00, 2,50, 7,50, 15,00, 22,50, 30,00 мкг/мл. Подтверждение внутрисерийной и межсерийной прецизионности и правильности было выполнено на шести уровнях концентраций: 0,05, 0,50, 1,50, 5,00, 12,50, 25,00 мкг/мл. Результаты валидации методики представлены в таблице 3.11.

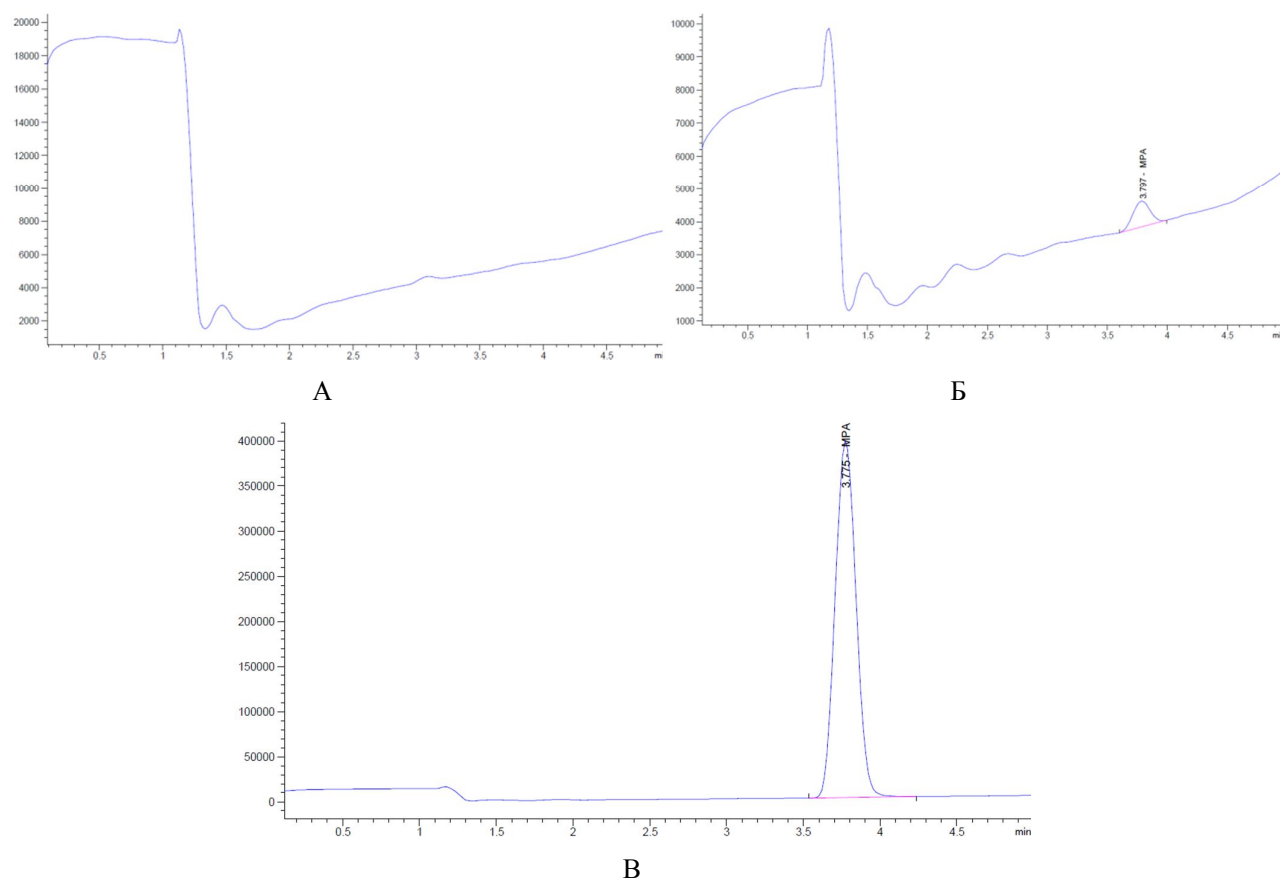


Рисунок 3.14. Примеры хроматограмм холостого образца (А) и образца с концентрацией МФК 0,05 мкг/мл (Б) и 30,00 мкг/мл (В)

Результаты валидации ВЭЖХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме

| Параметр                                    | Результат  |   |        |        |        |        |       |
|---|--|---|--------|--------|--------|--------|-------|
| Селективность                               | Хроматографические пики в области времени удерживания определяемого вещества на хроматограммах холостых образцов отсутствовали (рис. 3.14)   |   |        |        |        |        |       |
| Калибровочная кривая                        | Линейная зависимость, полученная с помощью метода наименьших квадратов (рис. 3.15, Прил.1, табл. 2): уравнение $y = a \cdot x$ , где:<br>x – концентрация МФК в плазме, мкг/мл;<br>y – площадь хроматографического пика МФК<br>a – угловой коэффициент |   |        |        |        |        |       |
| Концентрация, мкг/мл                        | 0,05   | 0,50  | 1,50   | 5,00   | 12,50  | 25,00  |       |
| Внутрисерийная правильность (отн. погр., %) | 1  | -4,80   | -10,88 | -13,44 | -14,02 | -12,84 | 1,95  |
|   | 2  | -2,51   | 11,82  | 11,27  | 0,25   | -9,19  | -2,45 |
|   | 3  | -1,49   | 9,41   | 12,33  | -1,09  | -3,74  | -1,63 |
| Межсерийная правильность (отн. погр., %)    | -2,94  | 3,45  | 3,37   | -4,95  | -8,59  | -0,71  |       |
| Внутрисерийная прецизионность (CV, %) (n=6) | 1  | 9,82  | 2,58   | 0,37   | 0,59   | 1,22   | 1,19  |
|   | 2  | 7,01  | 1,55   | 2,02   | 1,10   | 2,12   | 1,10  |
|   | 3  | 6,09  | 7,49   | 2,41   | 5,42   | 4,46   | 2,69  |
| Межсерийная прецизионность (CV, %) (n=18)   | 7,43   | 11,11   | 11,99  | 7,64   | 5,09   | 4,67   |       |
| Эффект переноса из предыдущей пробы         | Отсутствует  |   |        |        |        |        |       |
| Эффект разведения (n=6)                     | Образец с концентрацией 50,00 мкг/мл   | Среднее значение относительной погрешности = -3,82%, CV = 6,27% |        |        |        |        |       |
| Эффект матрицы (CV MF)                      | LQC (0,50 мкг/мл)  | 4,70%   |        |        |        |        |       |
|   | HQC (25,00 мкг/мл)   | 5,60%   |        |        |        |        |       |
| Степень извлечения (MF)                     | LQC (0,50 мкг/мл)  | 83,00% (CV=4,70%)   |        |        |        |        |       |
|   | HQC (25,00 мкг/мл)   | 80,82% (CV=5,60%)   |        |        |        |        |       |

Таким образом, разработанная методика определения МФК в плазме с применением ВЭЖХ-МС соответствует требованиям, установленным российскими и международными руководствами по валидации [22, 24, 85, 87]. Нижний предел количественного определения МФК составил 0,05 мкг/мл. Применение более длинной хроматографической колонки Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (100\*4,6мм, 3,5 мкм) позволило нивелировать эффект матрицы за счёт более эффективного разделения аналита и компонентов биологии.

ческой матрицы. Это сделало возможным не прибегать к использованию дорогостоящего изотопно-меченного стандарта МФК-D<sub>3</sub> для расчёта концентраций.

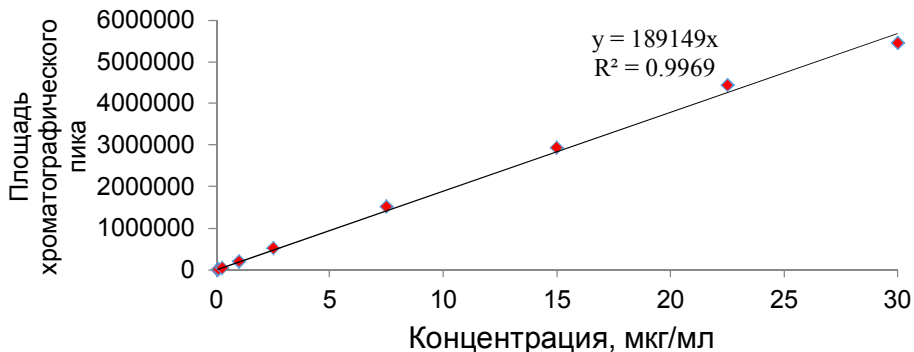


Рисунок 3.15. Пример калибровочной кривой при определении МФК методом ВЭЖХ-МС

### 3.1.3. Разработка методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методом ГХ-МС

На начальном этапе разработки методики была исследована возможность детектирования МФК без дериватизации. Детектирование проводилось при напряжении на филаменте 70 эВ в режиме «Scan» в диапазоне от 40 до 550 m/z (табл. 3.12). Для анализа использовалась колонка Mega 5-MS (25 м\*0,20 мм, 0,33 мкм). Начальные параметры хроматографического разделения следующие:

- температура испарителя - 275 °С;
- режим ввода - без деления потока;
- объём вводимой пробы – 1 мкл;
- начальная температура термостата 100 °С в течение 3 мин, нагрев со скоростью 25°С /мин до 300°С, 300°С - до конца анализа;
- скорость потока ПФ (гелий) – 1 мл/мин.

Таблица 3.12

Параметры масс-спектрометрического детектирования при определении МФК методом ГХ-МС

| Способ ионизации                | Ионизация электронами |
|---------------------------------|-----------------------|
| Напряжение на филаменте         | 70эВ                  |
| Ток эмиссии                     | 34,6 мкА              |
| Напряжение на ионном ускорителе | +29,79 В              |
| Напряжение на ионном умножителе | -1482 В               |

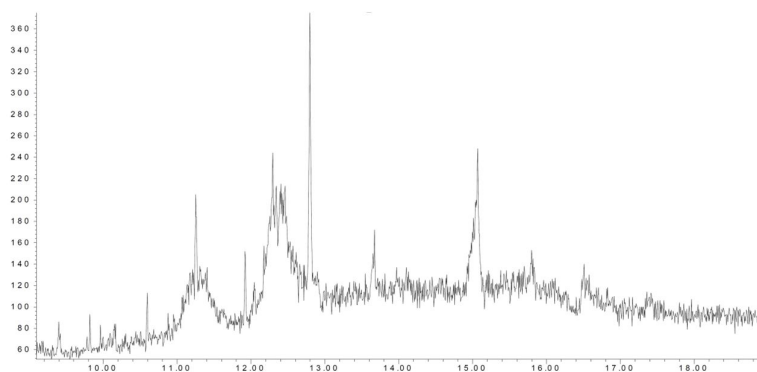


Рисунок 3.16. Хроматограмма, полученная после ввода раствора МФК в ацетонитриле в концентрации 5 мкг/мл

Таким образом, без использования дериватизации не удалось добиться формирования хроматографического пика МФК (рис. 3.16). Поэтому были получены триметилсилил-производные (TMS-производные) данного соединения путём выпаривания 50 мкл его стандартного раствора с концентрацией 5 мкг/мл на вакуумном концентраторе (60°C; 3500 об/мин) с последующим добавлением 50 мкл смеси BSTFA и TMCS (99:1, об./об.) и термостатирования при температуре 60°C в течении 40 мин. Хроматографирование осуществлялось в перечисленных выше условиях.

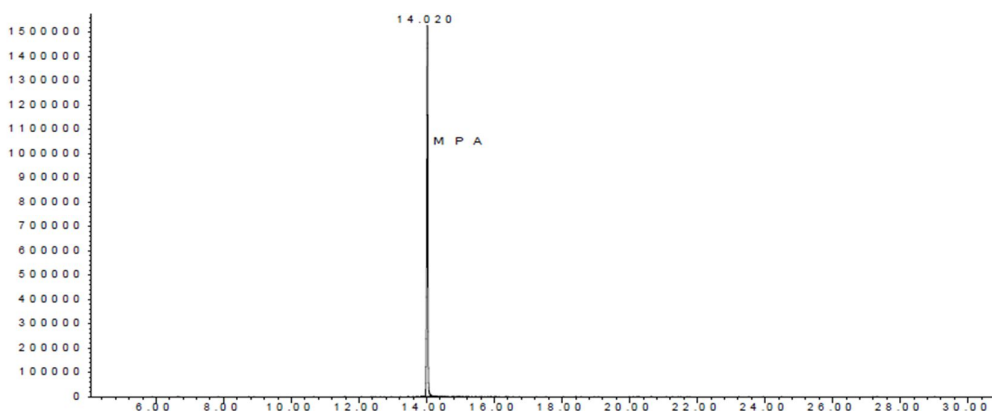


Рисунок 3.17. Хроматограмма TMS-производного МФК

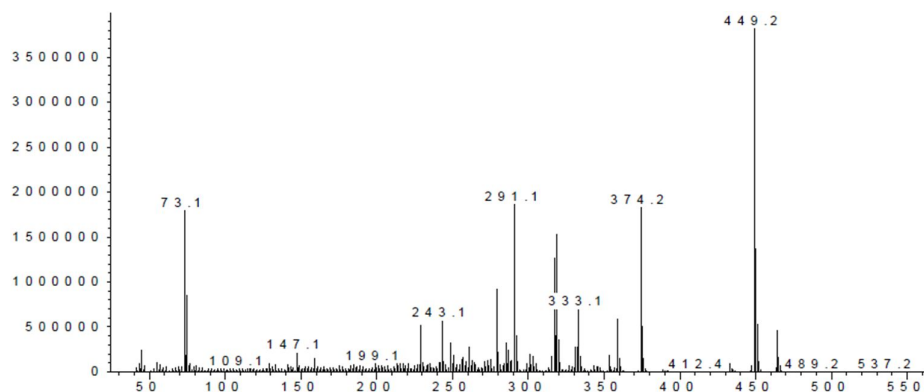


Рисунок 3.18. Масс-спектр TMS-производного МФК

При использовании триметилсилилирования был получен хроматографический пик деривата МФК (рис. 3.17). Значение  $m/z$  молекулярного иона составило 464, что свидетельствует об образовании ди-TMS-производного МФК (МФК-TMS) (рис. 3.18). Наиболее интенсивным в спектре является ион со значением  $m/z$  449, который образуется в результате деметилирования метоксигруппы в бензольном кольце (рис. 3.19). Поэтому детектирование в режиме SIM будет производиться путём регистрации данного иона.

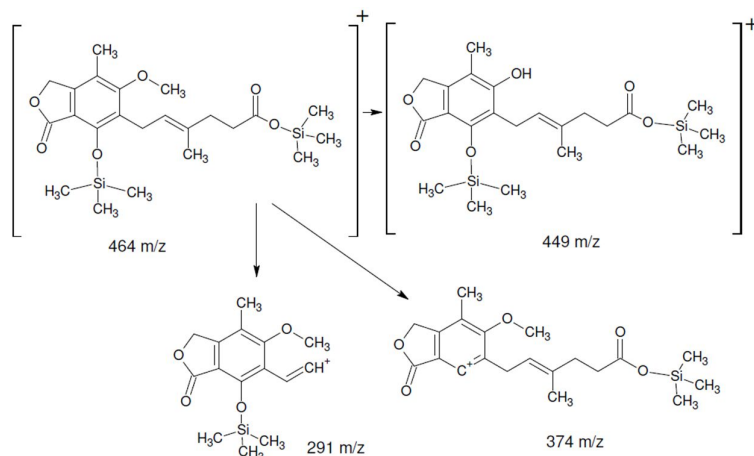


Рисунок 3.19. Схема фрагментации ди-TMS-производного МФК при ионизации электронами

При выборе температурной программы температура испарителя составила 275<sup>0</sup>С, объём вводимой пробы – 1 мкл; режим ввода пробы – без деления потока; скорость потока ПФ - 1 мл/мин; режим детектирования SIM - 449  $m/z$ . Начальная температура термостата также поддерживалась 100 °С в течение 3 мин. Уменьшение скорости подъёма температуры до 12,5 °С/мин приводило к увеличению времени удерживания ( $t_R$ ) с 14,029 мин до 20,475 мин (рис. 3.20), а уменьшение конечной температуры до 250 °С – ещё к большему увеличению  $t_R$  до 27,095 мин, а также к значительной потере чувствительности в 10 раз (рис. 3.21). Таким образом, первоначальная температурная программа является наиболее предпочтительной.



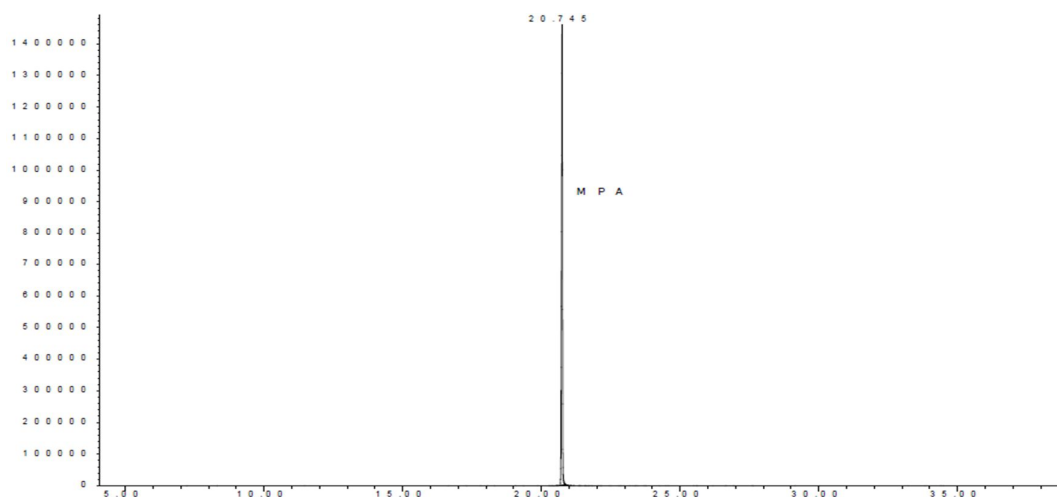


Рисунок 3.20. Хроматограмма TMS-производного МФК при скорости подъема температуры 12,5 °С/мин и конечной температуре 300 °С

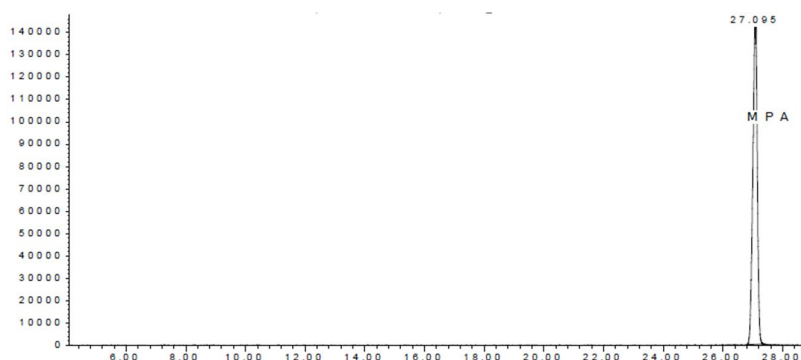


Рисунок 3.21. Хроматограмма TMS-производного МФК при скорости подъема температуры 25 °С/мин и конечной температуре 250 °С

В результате подбора температуры испарителя и режима ввода пробы установлено, что наиболее высокая чувствительность достигается при 300 °С и импульсном вводе пробы без деления потока. Время дериватизации в термостате при 60 °С в течение 20 мин является достаточным, т.к. увеличение продолжительности реакции триметилсилилирования не приводило к повышению площади хроматографического пика МФК-TMS (табл. 3.13).

Таблица 3.13

#### Оптимизация времени дериватизации микофеноловой кислоты

| № п/п | Время дериватизации, мин. | Площадь хроматографического пика |          |          |           |
|-------|---------------------------|----------------------------------|----------|----------|-----------|
|       |                           | 1                                | 2        | 3        | Ср. знач. |
| 1     | 10                        | 38147741                         | 39461114 | 38807928 | 38805594  |
| 2     | 20                        | 49014144                         | 48511789 | 48782967 | 48769633  |
| 3     | 30                        | 48881189                         | 48567291 | 48724540 | 48724340  |
| 4     | 40                        | 48691778                         | 49562151 | 49127465 | 49127131  |
| 5     | 50                        | 49256874                         | 48954411 | 49105643 | 49105643  |

### 3.1.3.1. Изучение зависимости степени извлечения микофеноловой кислоты из водных растворов от рН среды, природы органического растворителя и времени экстракции

В литературе опубликованы методики количественного определения МФК в биологических жидкостях с применением ЖЖЭ для изолирования данного соединения [5 48, 115, 145, 188]. Однако, в данных работах не приводится экспериментальное обоснование используемых условий экстракции, а именно выбора экстрагента, рН среды для перевода аналита в молекулярную форму и времени процесса извлечения.

Для подбора оптимальных условий экстракции к 1 мл фосфатного буферного раствора с рН 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 добавляли 50 мкл раствора МФК в концентрации 100 мкг/мл в ацетонитриле (концентрация МФК - 5 мкг/мл), далее добавляли 1 мл органического растворителя, метилхлорида (МХ), этилацетата или н-гексана, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек, а затем центрифугировали при 3500 об/мин в течение 5 мин. Затем слой органического растворителя отделяли, переносили в стеклянные вials объёмом 2 мл и выпаривали на вакуумном концентраторе при 45°C и 3500 об/мин в течение 15 мин. Сухой остаток реконструировали 50 мкл смесью BSTFA и TMS (99:1, об./об.) и дериватизировали. После этого 1 мкл данного раствора вводили в хроматографическую систему. При этом полученные средние значения площадей хроматографических пиков ди-TMS-производного МФК в экстрактах сравнивались с площадью хроматографических пиков данного соединения в концентрации 100 мкг/мл (с учётом 20-кратного концентрирования) в смеси BSTFA и TMS (99:1, об./об.). Результаты измерений представлены в прил. 3 и на рис. 3.22.

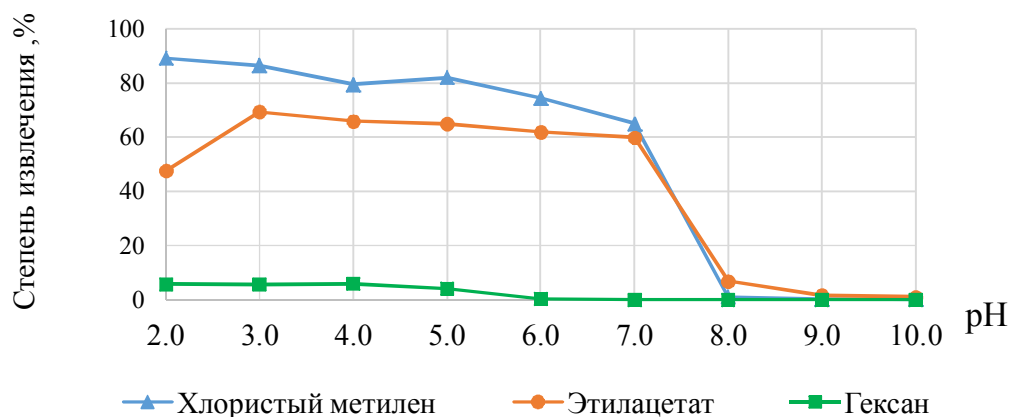


Рисунок 3.22. Изучение влияния природы органического растворителя и рН среды на степень извлечения микофеноловой кислоты

Как видно из данных, приведённых в прил. 3 и рис. 3.22, наибольшая степень извлечения (СИ) достигается при использовании метиленхлорида при pH 2,0. Резкое уменьшение СИ при смещении pH среды в щелочную сторону связано с переводом молекулы МФК, которая является органической кислотой, в ионизированную форму, что препятствует её переходу в органическую фазу.

Для выбора оптимального **времени экстракции** к 1 мл фосфатного буферного раствора (БР) с pH 2,0 добавляли 50 мкл раствора МФК в концентрации 100 мкг/мл в ацетонитриле (концентрация раствора МФК - 5 мкг/мл), далее добавляли 1 мл органического растворителя метиленхлорида. Полученная смесь перемешивалась на вортексе в течение 30 сек, 1 мин, 2 мин, 5 мин. Дальнейшая пробоподготовка осуществлялась аналогичным образом. Полученные результаты представлены в табл. 3.14.

Таблица 3.14

## Влияние времени экстракции на степень извлечения МФК

| Время экстракции | Площадь хроматографического пика |          |           | СИ, % |
|------------------|----------------------------------|----------|-----------|-------|
|                  | 1                                | 2        | Ср. знач. |       |
| 30 сек.          | 43187990                         | 45017361 | 44102676  | 89,77 |
| 1 мин.           | 42974510                         | 44178122 | 43576316  | 88,70 |
| 2 мин.           | 43575217                         | 43047855 | 43311536  | 88,16 |
| 5 мин.           | 44964782                         | 43527727 | 44246255  | 90,06 |

Как видно из данных, приведённых в табл. 3.14, увеличение времени экстракции практически не влияет на СИ. Поэтому перемешивание смеси на вортексе в течение 30 сек является достаточным для максимального извлечения аналита.

*3.1.3.2. Подбор условий экстракции микофеноловой кислоты из плазмы*

Выбор оптимальных условий для извлечения МФК из плазмы крови производился на образце с концентрацией аналита 0,05 мкг/мл (НПКО). Для этого к плазме добавлялся фосфатный буферный раствор с pH=1,8 (для доведения pH до 2,0) в соотношении 2:1 (плазма/буферный раствор) и определённое количество МХ (табл. 3.15). Полученную смесь перемешивалась на вортексе в течение 30 сек, а затем подвергалась центрифугированию при 3500 об/мин в течение 10 мин. Затем слой органического растворителя отделялся и выпаривался в стеклянных виалах объёмом 2 мл на вакуумном концентраторе при 45°C и 3500 об/мин в течение 15 мин. Сухой остаток реконструировался 50 мкл смеси BSTFA и TMCS (99:1) и дериватизировали в термостате. После этого 1 мкл

данного раствора вводился в хроматографическую систему и анализировался в указанных выше условиях.

Таблица 3.15

## Подбор условий изолирования МФК из плазмы крови

| № | Объём образца НПКО, мл | Объём фосфатного БР с рН 1,8, мл | Объём МХ, мл | S пика ди-TMS-производного МФК |        |           |
|---|------------------------|----------------------------------|--------------|--------------------------------|--------|-----------|
|   |                        |                                  |              | 1                              | 2      | Ср. знач. |
| 1 | 0,250                  | 0,125                            | 1            | 42561                          | 43857  | 43209     |
| 2 | 0,500                  | 0,250                            | 1            | 85289                          | 89521  | 87405     |
| 3 | 1,000                  | 0,500                            | 1            | 100756                         | 105789 | 103273    |
| 4 | 1,000                  | 0,500                            | 2            | 110589                         | 112178 | 111384    |

Как видно из данных, приведённых в табл. 3.15 и рис. 3.23, даже при экстракции из 0,25 мл плазмы 1 мл хлористого метилена удалось достичь достаточной площади хроматографического пика аналита. Данные условия выбраны для дальнейшего исследования, так как они позволяют минимизировать объём плазмы, необходимой для проведения анализа образцов, полученных от добровольцев, а также приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества. Кроме того, при изолировании МФК из больших объёмов плазмы концентрация его TMS-производного в экстракте будет значительно выше, что может привести к значительному переносу определяемого вещества из предыдущей пробы.

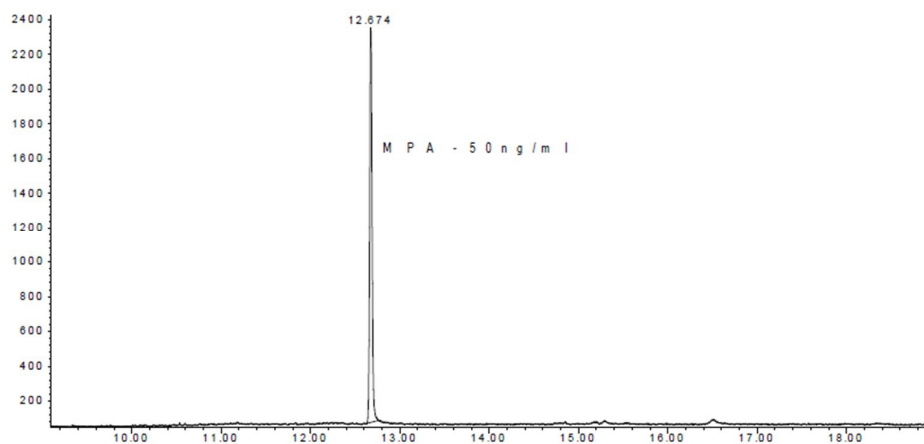


Рисунок 3.23. Пример хроматограммы ди-TMS-МФК после экстракции из 0,25 мл образца плазмы с концентрацией аналита на уровне 0,05 мкг/мл

Таким образом, для проведения пробоподготовки при количественном определении МФК в плазме методом ГХ/МС были выбраны следующие условия: к 250 мкл плазмы добавлялось 125 мкл фосфатного буферного раствора рН = 1,8 и 1 мл дихлорметана, полученная смесь перемешивалась на вортексе в течение 30 сек, а затем центрифугировалась при 3500 об/мин. Слой органического растворителя отделяли и переносили в стек-

лянные вials объемом 2 мл. Экстракт выпаривался на вакуумном концентраторе при 45°C и 3500 об/мин в течение 15 мин. К сухому остатку добавлялось 50 мкл смеси BSTFA и TMCS (99:1, об./об.). Дериватизация проводилась в термостате при 60 °C в течение 20 мин. После этого 1 мкл данного раствора вводили в хроматографическую систему [108].

### 3.1.3.3. Валидация ГХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме

Аналитический диапазон ГХ-МС-методики определения МФК составил 0,05 - 30,0 мкг/мл. Концентрации калибровочных образцов и образцов контроля качества использовались такие же, как и при валидации ВЭЖХ-МС-методики. Результаты валидации методики представлены в табл. 3.16 [108].

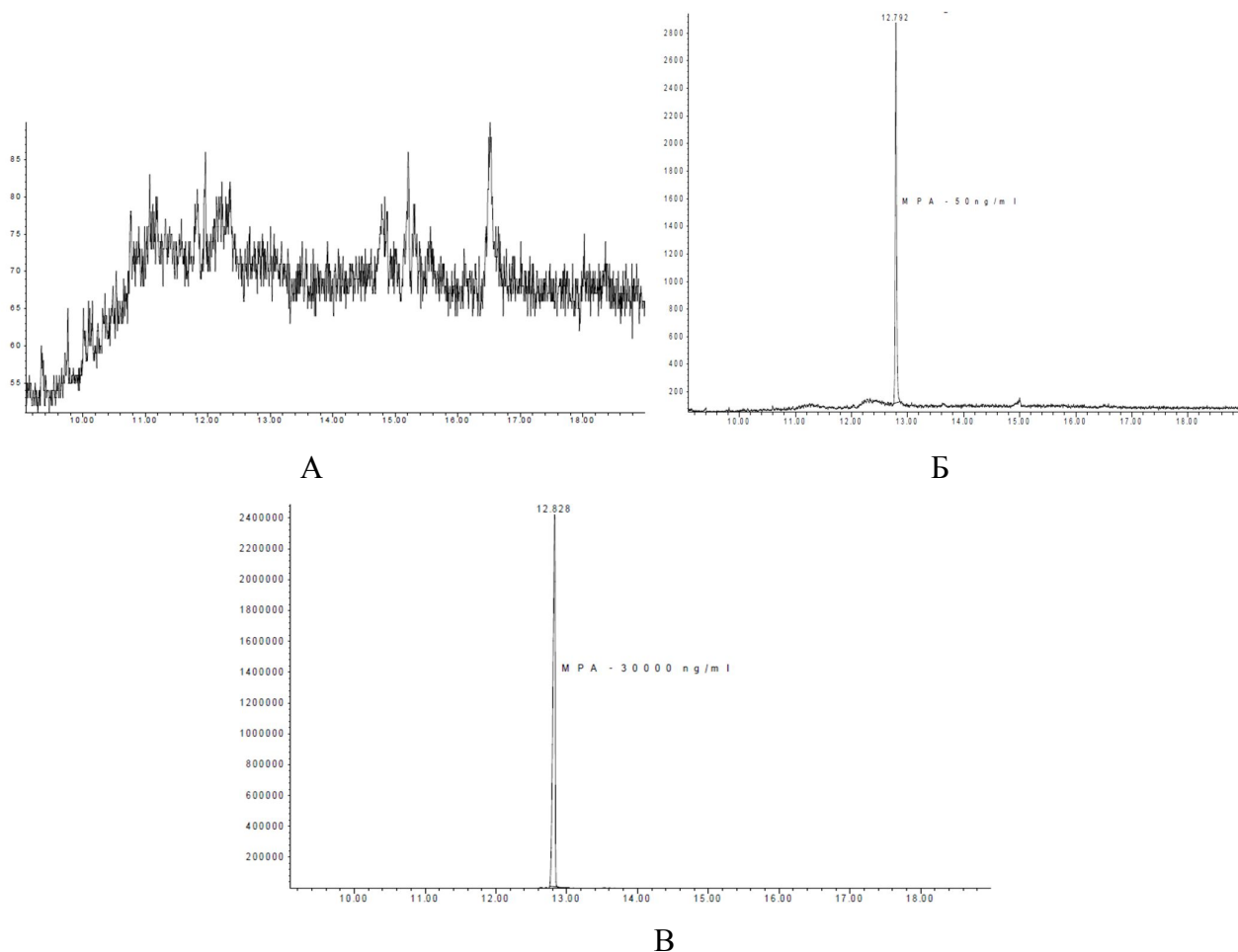


Рисунок 3.24. Примеры хроматограмм холостого образца плазмы (А) и образца с концентрацией МФК 0,05 мкг/мл (Б) и 30,00 мкг/мл (В)

Результаты валидации ГХ-МС-методики определения микофеноловой кислоты в плазме

| Параметр  |   | Результат  |      |   |       |       |       |
|---|---|--|------|---|-------|-------|-------|
| Селективность                                     |   | Хроматографические пики в области времени удерживания определяемого вещества на хроматограммах холостых образцов отсутствовали (рис. 3.24)   |      |   |       |       |       |
| Калибровочная кривая                              |   | Линейная зависимость, полученная с помощью метода наименьших квадратов (рис. 3.25, Прил.1, табл. 3): уравнение $y = a \cdot x$ , где:<br>x – концентрация МФК в плазме, мкг/мл;<br>y – площадь хроматографического пика МФК<br>a – угловой коэффициент |      |   |       |       |       |
| Концентрация, мкг/мл                              |   | 0,05   | 0,50 | 1,50  | 5,00  | 12,50 | 25,00 |
| Внутрисерийная правильность (n=6) (отн. погр., %) | 1 | -14,35   | 6,82 | 4,02  | 6,36  | 6,36  | 5,72  |
|   | 2 | -11,72   | 3,08 | 1,06  | -0,61 | -0,22 | -0,26 |
|   | 3 | -12,88   | 4,06 | 1,84  | -0,51 | -0,78 | 1,19  |
| Межсерийная правильность (n=18) (отн. погр., %)   |   | -12,98   | 4,65 | 2,31  | 1,74  | 1,79  | 2,22  |
| Внутрисерийная прецизионность (n=6) (CV, %)       | 1 | 4,77   | 4,97 | 5,58  | 2,91  | 5,03  | 3,61  |
|   | 2 | 4,54   | 2,75 | 3,42  | 4,90  | 5,36  | 5,56  |
|   | 3 | 4,17   | 1,95 | 2,17  | 3,26  | 3,19  | 4,12  |
| Межсерийная прецизионность (n=18) (CV, %)         |   | 4,80   | 3,93 | 4,32  | 5,08  | 5,80  | 5,27  |
| Эффект переноса из предыдущей пробы               |   | При вводе холостого образца BSTFA между пробами перенос отсутствует  |      |   |       |       |       |
| Эффект разведения (n=6)                           |   | Образец с концентрацией 50,00 мкг/мл   |      | Среднее значение относительной погрешности = 1,97; CV = 6,86% |       |       |       |
| Эффект матрицы (CV MF)                            |   | LQC (0,50 мкг/мл)  |      | 2,28%   |       |       |       |
|   |   | HQC (25,00 мкг/мл)   |      | 2,80%   |       |       |       |
| Степень извлечения (MF)                           |   | LQC (0,50 мкг/мл)  |      | 87,85% (CV=2,28%)   |       |       |       |
|   |   | HQC (25,00 мкг/мл)   |      | 89,53% (CV=2,80%)   |       |       |       |

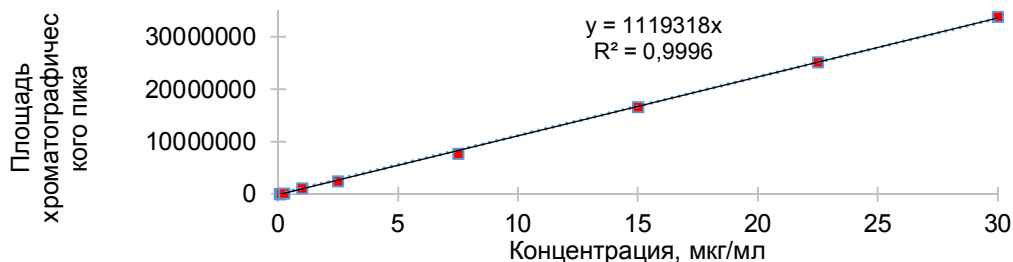


Рисунок 3.25. Пример калибровочной кривой при определении МФК методом ГХ-МС

В рамках валидации данной методики также изучалась стабильность TMS-производного МФК при хранении в течение 48 ч в автосемплере (табл. 3.17). Полученные результаты отвечали установленным требованиям.

Таблица 3.17

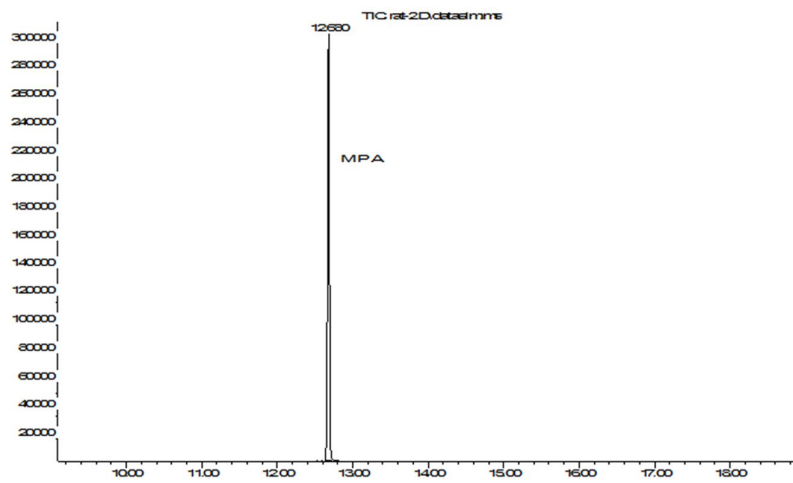
Результаты оценки стабильности ди-TMS-производного МФК при хранении в автосемплере

|  | Исходные значения | Краткосрочная стабильность (48 ч. при комнатной температуре) |
|--|-------------------|--|
| образцы КК нижнего уровня концентраций – 0,50 мкг/мл   |                   |  |
| Сред. знач. (n=6)                                      | 0,534             | 0,537  |
| SD   | 0,027             | 0,037  |
| CV, %  | 4,97              | 6,85   |
| Концентрация, % от исходного уровня                    | 106,82            | 107,333  |
| образцы КК верхнего уровня концентраций – 25,00 мкг/мл |                   |  |
| Сред. знач. (n=6)                                      | 26,430            | 26,079   |
| SD   | 0,954             | 1,002  |
| CV, %  | 3,61              | 3,84   |
| Концентрация, % от исходного уровня                    | 105,72            | 104,317  |

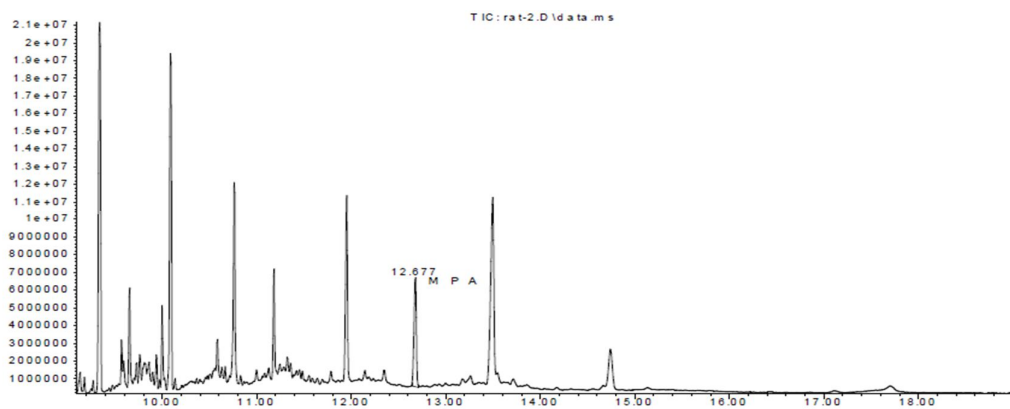
Таким образом, была впервые разработана и валидирована методика определения МФК в плазме крови методом ГХ-МС. Применение жидкостно-жидкостной экстракции для пробоподготовки, а также дериватизации аналита путём триметилсилилирования позволило достичь сопоставимого с ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС уровня чувствительности: нижний предел количественного определения МФК составил 0,05 мкг/мл.

#### ***3.1.4. Перекрёстная валидация разработанных методик определения микофеноловой кислоты в плазме крови***

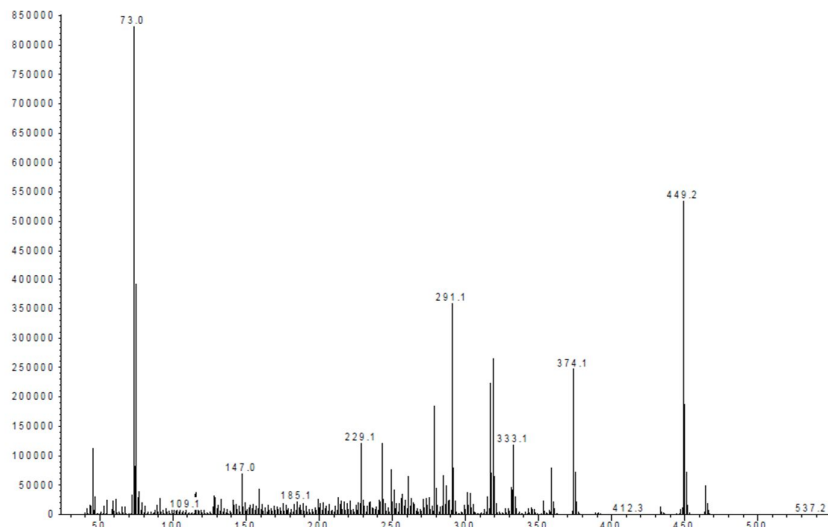
При проведении перекрёстной валидации в качестве референтной методики была выбрана ВЭЖХ-МС/МС–методика, т.к. в данном случае для расчёта концентраций МФК применяется изотопно-меченный внутренний стандарт МФК-D<sub>3</sub>. По данным многочисленных публикаций, а также нормативной документации, данный способ расчёта является наиболее предпочтительным [22, 26, 40, 85, 87, 152].



А



Б



В

Рисунок 3.26. Пример SIM- хроматограммы (А), ТИС-хроматограммы (Б) и масс-спектра (В) ди-TMS-производного МФК, полученные после анализа образцов плазмы крыс



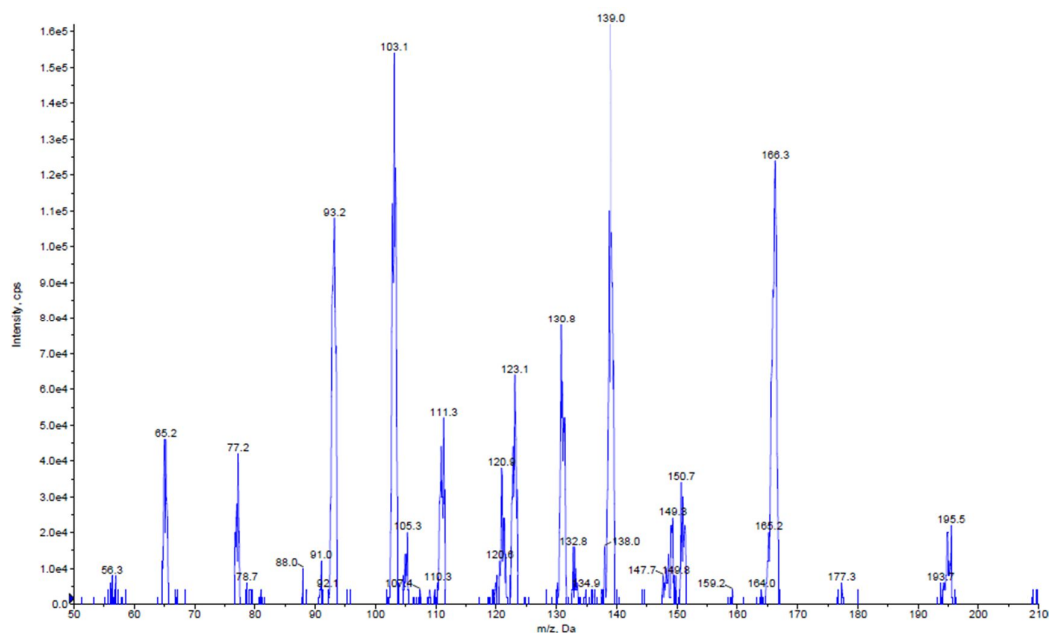
Перекрёстная валидация методик определения микофеноловой кислоты в плазме  
крови

| № образца   | Результаты определения методом ВЭЖХ-МС/МС | Результаты определения методом ВЭЖХ-МС |         | Результаты определения методом ГХ-МС |         |
|-------------|---|--|---------|--------------------------------------|---------|
|             |   | Абс., мкг/мл                           | Отн., % | Абс., мкг/мл                         | Отн., % |
| 1           | 9,82                                      | 9,35                                   | 95,18   | 9,63                                 | 98,11   |
| 2           | 8,65                                      | 8,96                                   | 103,55  | 8,16                                 | 94,27   |
| 3           | 5,64                                      | 5,18                                   | 91,86   | 5,57                                 | 98,80   |
| 4           | 9,61                                      | 9,66                                   | 100,58  | 10,38                                | 108,01  |
| 5           | 12,36                                     | 12,31                                  | 99,62   | 11,86                                | 95,94   |
| 6           | 9,02                                      | 9,01                                   | 99,81   | 9,57                                 | 105,99  |
| 7           | 4,63                                      | 4,95                                   | 106,93  | 4,62                                 | 99,82   |
| 8           | 20,09                                     | 21,40                                  | 106,54  | 19,60                                | 97,54   |
| 9           | 9,18                                      | 9,65                                   | 105,05  | 10,01                                | 109,00  |
| 10          | 7,44                                      | 7,89                                   | 106,10  | 8,20                                 | 110,26  |
| Сред. знач. |   |  | 101,77  | -                                    | 101,52  |

Как видно из данных, приведённых в табл. 3.18, относительные концентрации МФК при определении методом ВЭЖХ-МС находится в диапазоне 95,18-106,93%, при определении ГХ-МС – 94,27-110,26%, что отвечает критериям приемлемости [22, 24, 85, 87]: погрешность измерений не превышает  $\pm 20\%$  для более 67% образцов. Масс-спектры ди-TMS-производного МФК, полученные после анализа образцов плазмы крыс, полностью совпадает с масс-спектром стандартного образца (рис. 3.18, 3.26). Таким образом, результаты перекрёстной валидации свидетельствуют о высокой степени сходимости разработанных методик.

### 3.2. Разработка методики количественного определения метилдопы в плазме крови

Подбор условий масс-спектрометрического детектирования проводился путём анализа раствора МД в метаноле в концентрации 0,1 мкг/мл в режиме FIA. Наибольшая величина ионного тока была достигнута в режиме регистрации положительных ионов. Масс-спектры, получившиеся в результате фрагментации молекулярного иона МД и МД-D<sub>3</sub>, представлены на рис. 3.27. Дочерние ионы 166 m/z и 169 m/z образуются в результате декарбоксилирования молекулярных ионов МД и МД-D<sub>3</sub>, дочерний ион 139 m/z – в результате отщепления аминогруппы и метильной группы. Катион-радикалы 103 m/z и 105 m/z получают за счёт элиминирования катехинового фрагмента, а наличие дочернего иона 93 m/z свидетельствует о формировании фенилкатиона из данного фрагмента (рис. 3.28).



A

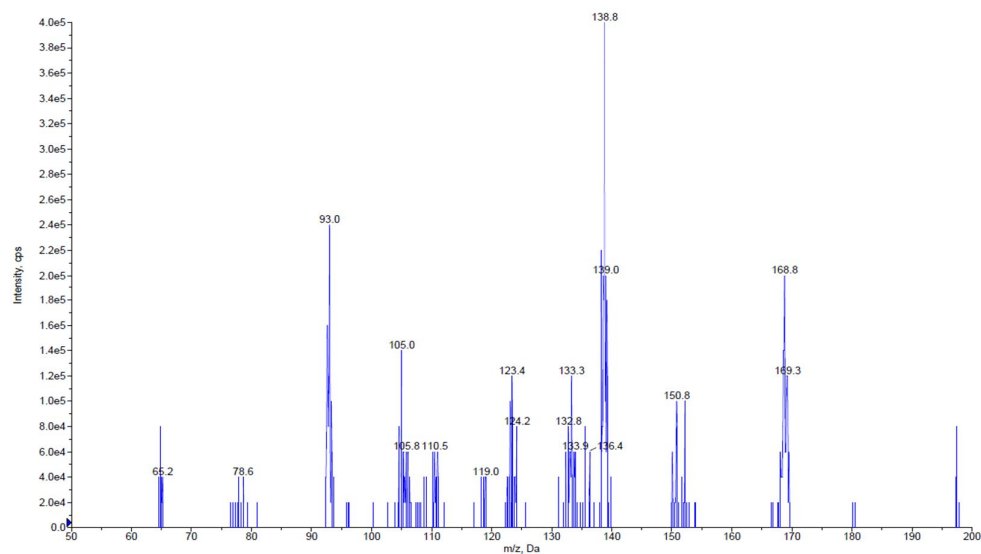


Рисунок 3.27. Масс-спектры молекулярных ионов метилдопы (А) и дейтерированного внутреннего стандарта метилдопы- $D_3$  (Б)

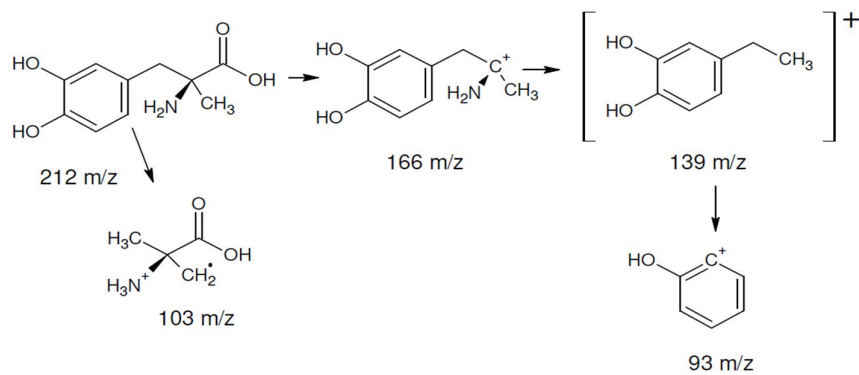


Рисунок 3.28. Схема фрагментации метилдопы

Максимальная величина аналитического сигнала достигается при детектировании метилдопы по MRM-переходу  $212 \rightarrow 139$  m/z в условиях, приведённых в таблице 3.19. Для МД-D<sub>3</sub> был выбран MRM – переход  $215 \rightarrow 169$  m/z.

Таблица 3.19

Параметры масс-спектрометрического детектирования метилдопы

| Параметр                          | Значение   |
|-----------------------------------|------------|
| Режим                             | DUIS       |
| Напряжение электроспрея           | 4000 В     |
| Поток распыляющего газа           | 3 мл/мин.  |
| Поток нагревающего газа           | 5 мл/мин.  |
| Поток осушающего газа             | 15 мл/мин. |
| Температура интерфейса            | 350°C      |
| Температура нагревательного блока | 300°C      |
| Температура линии десольватации   | 250°C      |
| Давление газа в ячейке соударений | 270 кПа    |

При подборе условий хроматографического разделения метилдопы использовалась колонка Synergi Fusion – RP 80A (150\*3,0 мм, 4 мкм) на основе октадецилсиликигеля с добавкой полярных лигандов. Начальные параметры были следующие: скорость потока - 0,4 мл/мин; температура термостата - 40°C; ПФ - метанол : вода : водный раствор формиата аммония в концентрации 80 ммоль/мл (pH=3,5) в соотношении 40:40:20 (об/об/об). При этом время удерживания исследуемого вещества составило 2,956 мин, площадь хроматографического пика – 29480 ЕД\*с. (рис. 3.29).

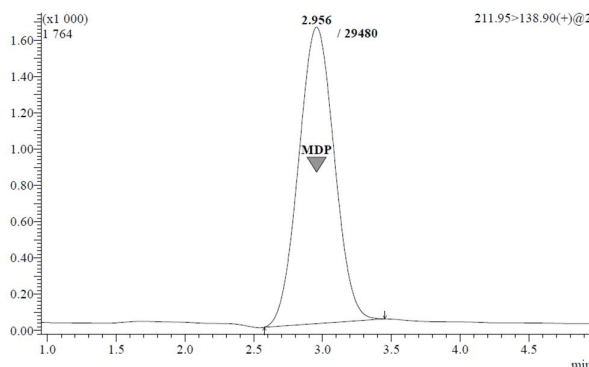


Рисунок 3.29. Хроматограмма раствора метилдопы в метаноле в концентрации 1 мкг/мл (колонка Synergi Fusion – RP 80A, (150\*3,0 мм, 4 мкм))

Для увеличения удерживания аналита применялась двумерная хроматография с добавлением второй колонки Luna Phenyl-Hexyl (50\*3,0 мм, 5 мкм) на основе фенилгексилсиликагеля. Состав ПФ и соотношение растворителей, температура термостата не изменялись. Поток элюента до 0,75 мин с колонки Luna Phenyl-Hexyl (50\*3,0 мм, 5 мкм) (колонка №1) направляется на слив (Положение 1 > 6), с 0,75 мин до 1,05 мин поток ПФ

с колонки №1 направляется на колонку Synergi Fusion – RP 80A (150\*3,0 мм, 4 мкм) (колонку №2) (Положение 1 > 2), с 1,05 мин до конца анализа поток ПФ с колонки №1 направляется на слив, с колонки №2 – в масс-спектрометрический детектор (Положение 1 > 6) (рис. 3.30). При этом с 1,25 мин до 4,25 мин анализа скорость потока насоса 1 увеличивалась до 1,0 мл/мин (табл. 3.20). Данный приём часто используется при биоаналитических исследованиях для более быстрого элюирования тяжело удерживающихся эндогенных соединений [26, 92, 118]. Новые параметры позволили увеличить время удерживания аналита до 5,288 мин, площадь хроматографического пика – до 1147774 ЕД\*с (рис 3.31) [37, 107, 108].

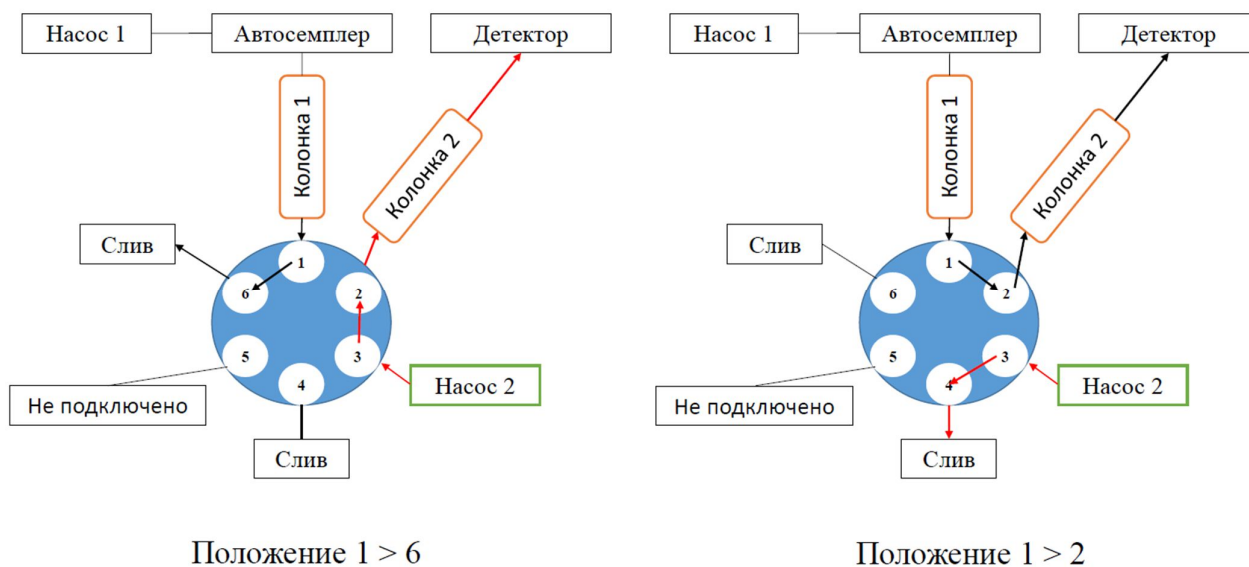


Рисунок 3.30. Схема переключения 6- портового крана в процессе хроматографического разделения МД

Таблица 3.20

Параметры элюирования при определении метилдопы

| Время, мин. | Насос 1                  | Насос 2                  |
|-------------|--------------------------|--------------------------|
|             | Скорость потока, мл/мин. | Скорость потока, мл/мин. |
| 0,00        | 0,4                      | 0,4                      |
| 1,25        | 0,4                      |                          |
| 1,26        | 1,0                      |                          |
| 4,25        | 1,0                      |                          |
| 4,26        | 0,4                      |                          |
| 8,00        | 0,4                      |                          |

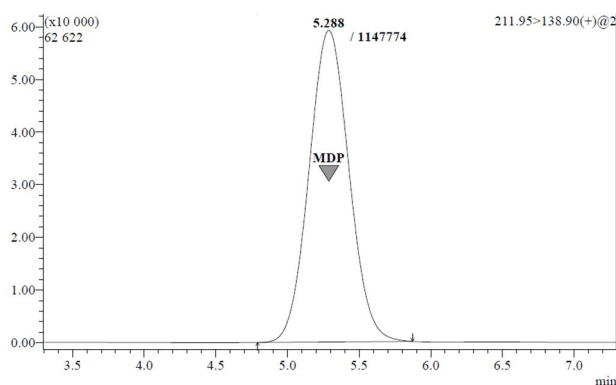


Рисунок 3.31. Хроматограмма раствора метилдопы в метаноле в концентрации 1 мкг/мл при использовании двумерной хроматографии

В качестве метода подготовки образцов плазмы для данного исследования было выбрано осаждение белков. При этом были использованы следующие условия: аликвоту стабилизированной плазмы 100 мкл подвергали депротеинизации 400 мкл раствора МД- $D_3$  в концентрации 0,125 мкг/мл в метаноле, полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек, подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 3500 об/мин и температуре +4°C. Объём вводимой пробы составил 8 мкл [37, 41, 108, 109].

### ***3.2.1. Предварительное изучение краткосрочной стабильности метилдопы в плазме и подбор стабилизатора для предотвращения её окисления***

Предварительное изучение краткосрочной стабильности и стабильности при замораживании/размораживании метилдопы выполнялось на образцах контроля качества верхнего уровня концентраций 2,40 мкг/мл с использованием плазмы крови, стабилизированной  $K_3$ ЭДТА и гепаринатом лития. При этом оценивалась разница между соотношениями площадей пиков «МД/МД- $D_3$ », полученных до и после испытаний. Полученные результаты не отвечали критериям приемлемости (табл. 3.21): метилдопа значительно разлагалась в плазме при хранении в течение 24 ч при комнатной температуре при применении обоих антикоагулянтов, а также после 3 циклов заморозки/разморозки в  $K_3$ ЭДТА-плазме.

При дальнейшем исследовании стабильности аналита при комнатной температуре, а также при температуре не выше -20°C из образцов плазмы через определённые промежутки времени отбирались аликвоты объёмом 100 мкл для определения МД. Содержание определяемого вещества в плазме для данного испытания было увеличено до 3,00 мкг/мл (калибровочный образец ВПКО) для определения МД в более поздние сроки

хранения из-за риска быстрого окисления. Концентрация аналита выходила за рамки допустимого предела (85,0 – 115,0 % от исходной) через 2,5 ч хранения при комнатной температуре и 16 ч хранения при температуре не выше -20°C (табл. 3.21). Поскольку МД разлагается даже при хранении в морозильной камере за достаточно короткий промежуток времени (16 ч), для её стабилизации необходимо добавление к плазме раствора антиоксиданта [37, 107, 108].

Таблица 3.21

Оценка стабильности метилдопы в плазме крови при комнатной температуре и при замораживании до температуры не выше - 20°C

|          | Концентрация, % от исходного уровня (n=2) |                 |
|----------|---|-----------------|
|          | К <sub>3</sub> ЭДТА                       | Гепаринат лития |
| Время, ч | Комнатная температура                     |                 |
| 0        | 100,0                                     | 100,0           |
| 1,0      | 89,0                                      | 92,3            |
| 2,5      | 77,6                                      | 83,2            |
| 6,0      | 55,1                                      | 65,5            |
| 12,0     | 29,9                                      | 45,0            |
|          | Температура не выше - 20°C                |                 |
| 0        | 100,0                                     | 100,0           |
| 16,0     | 84,0                                      | 81,5            |
| 24,0     | 80,0                                      | 75,3            |
| 36,0     | 77,3                                      | 66,1            |

Таблица 3.22

Подбор стабилизаторов для предотвращения окисления метилдопы

| Стабилизатор   | Концентрация стабилизатора, %  | Краткосрочная стабильность (24 ч при комнатной температуре), n=2 | Стабильность при замораживании / размораживании, n=2 | Краткосрочная стабильность (24 ч при комнатной температуре), n=2 | Стабильность при замораживании / размораживании, n=2 |
|--|--|--|--|--|--|
|  |  | % от начальной концентрации метилдопы                            |  |  |  |
|  |  | К <sub>3</sub> ЭДТА  |  | Гепаринат лития  |  |
| Без добавления стабилизатора                                       | -  | 30,29  | 80,04  | 47,16  | 93,18  |
| Аскорбиновая кислота   | 5  | 88,44  | 102,30   | 80,91  | 99,69  |
|  | 10   | 94,91  | 96,17  | 78,76  | 93,21  |
| Смесь аскорбиновой кислоты, натрия гидрокарбоната, натрия сульфита | 5% аск. к-ты;<br>2,4% NaHCO <sub>3</sub> ;<br>0,2% Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> | 89,31  | 98,24  | 72,48  | 95,07  |
| Натрия тиосульфат  | 5  | 45,65  | 101,86   | 79,41  | 93,91  |
|  | 10   | 31,32  | 99,81  | 83,46  | 97,78  |
| Натрия метабисульфит   | 5  | 66,84  | 102,68   | 75,79  | 90,70  |
|  | 10   | 75,99  | 97,25  | 73,22  | 88,70  |
| Натрия сульфит   | 5  | -  | -  | -  | -  |
|  | 10   | -  | -  | -  | -  |

Выбор комбинации стабилизатора и антикоагулянта проводился путём добавления водных растворов антиоксидантов из расчёта 0,2 мл раствора антиоксиданта на 1 мл плазмы крови (1:5, об./об.). При этом использовались водные растворы аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, тиосульфата и метабисульфита в концентрациях 5 и 10%, а также смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 2,4% и 0,2%, соответственно (пропись инъекционного раствора аскорбиновой кислоты в концентрации 5% [4]). Оценка концентрации аналита осуществлялась также сравнением соотношений площадей хроматографических пиков «МД/МД-D<sub>3</sub>», полученным перед началом и после испытания.

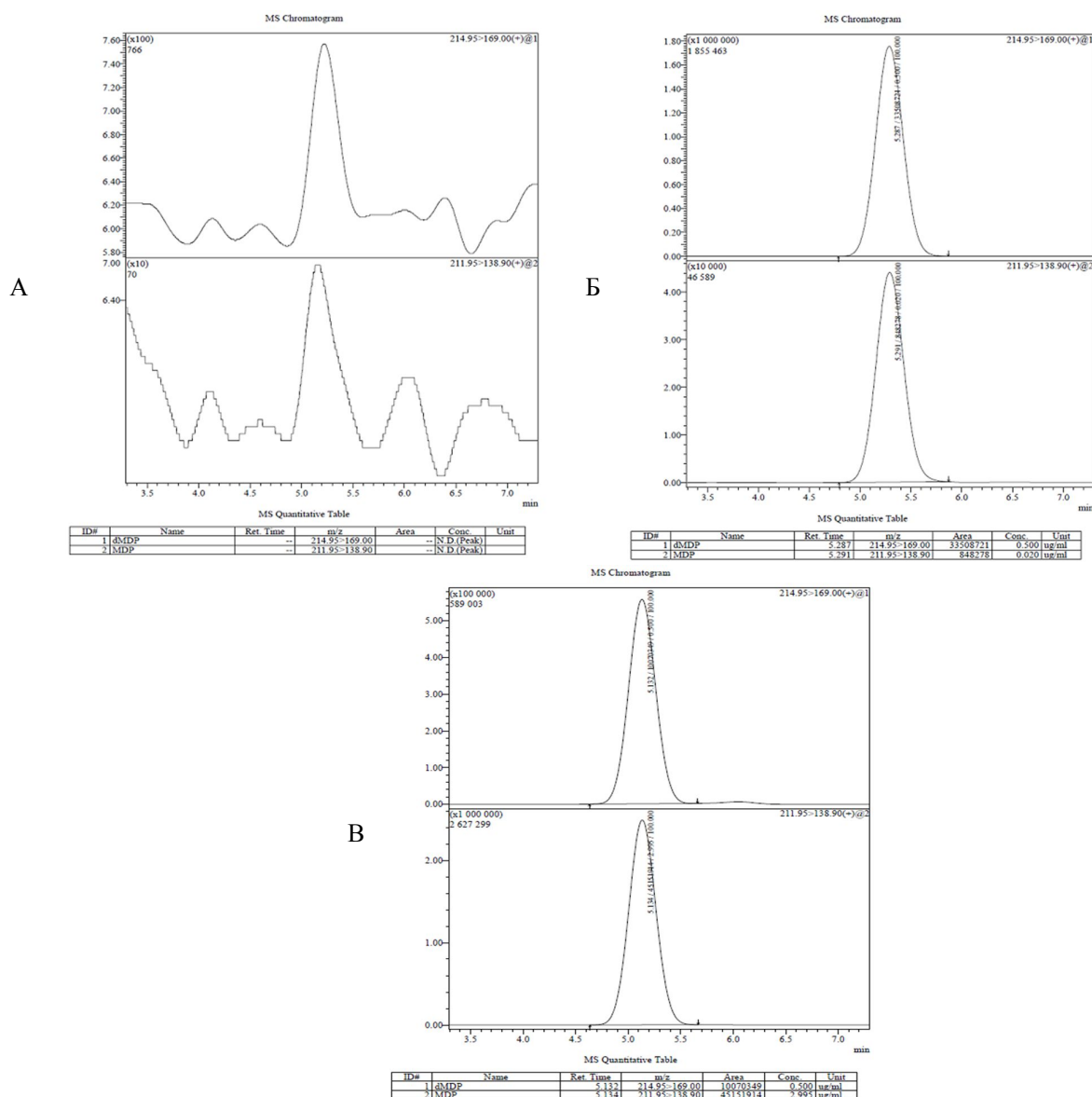
Применение растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 5 и 10% и раствора, содержащего смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, в комбинации с К<sub>3</sub>ЭДТА позволило предотвратить окисление МД в течение 24 ч хранения при комнатной температуре, а также в течение 3-х циклов замораживания/размораживания (табл. 3.22). Так как при добавлении перечисленных выше растворов к плазме в объёмном соотношении 1:5 удалось стабилизировать аналит, исследование более концентрированных соотношений (1:2 или 1:1) не проводилось.

Для валидации методики и проведения исследования БЭ была выбрана смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита и натрия гидрокарбоната, т.к. её использование позволяло повысить чувствительность методики в 1,6 раза: среднее значение площади хроматографического пика аналита (при n=6) при использовании данной смеси составило 110426735 ЕД\*с, а при использовании 5 и 10%-х растворов чистой аскорбиновой кислоты – 67260177 ЕД\*с и 66341575 ЕД\*с, соответственно. Изменения условий подготовки проб при валидации и анализе испытуемых образцов после добавления к плазме стабилизатора не потребовалось.

Надосадочная жидкость, полученная после осаждения белков метанолом в плазме, стабилизированной раствором сульфита натрия, в течение 2 ч хранения в условиях авто-сеплера превращалась в вязкую гелеобразную массу. Это не позволяло вводить данные образцы в хроматографическую систему. Поэтому применение этого антиоксиданта является не возможным. Следует отметить, что при его использовании в более низкой концентрации в комбинации с аскорбиновой кислотой и натрия гидрокарбонатом полученный депротеинизат полностью сохранял свои реологические свойства [37, 107, 108].

### 3.2.2. Валидация методики определения метилдопы в плазме методом ВЭЖХ-МС/МС

Для проведения исследования биоэквивалентности метилдопы был выбран аналитический диапазон 0,02 – 3,00 мкг/мл. Калибровочные кривые содержали 8 калибровочных концентраций: 0,02, 0,10, 0,25, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00 мкг/мл. Подтверждение внутрисерийной и межсерийной прецизионности и правильности выполнялось на шести уровнях концентраций: 0,02, 0,06, 0,30, 1,20, 2,40, 3,00 мкг/мл. Результаты валидации методики представлены в табл. 3.23 [37, 107, 108].



MDP – хроматограмма метилдопы (212 → 139 m/z) (нижняя); dMDP – хроматограмма внутреннего стандарта (215 → 169 m/z) (верхняя)

Рисунок 3.32. Примеры хроматограмм холостого образца плазмы (А) и образца с концентрацией метилдопы 0,02 мкг/мл (Б) и 3,00 мкг/мл (В)



## Результаты валидации ВЭЖХ-МС/МС-методики определения метилопы в плазме

| Параметр                                    |   | Результат  |       |  |       |       |      |
|---|---|--|-------|--|-------|-------|------|
| Селективность                               |   | Площади хроматографических пиков эндогенных соединений в области времени удерживания МД и МД-D <sub>3</sub> на хроматограммах холостых образцов не превышали 20% от площади пика образца НПКО и 5% от площади ВС (рис. 3.32)   |       |  |       |       |      |
| Калибровочная кривая                        |   | Линейная зависимость, полученная с помощью взвешенного метода наименьших квадратов (рис. 3.33, Прил. 1, табл. 4): уравнение $y = a \cdot x + b$ , где:<br>$x$ – концентрация МД в плазме, мкг/мл;<br>$y$ – соотношение площадей хроматографических пиков «МД/МД-D <sub>3</sub> »<br>$a$ – угловой коэффициент<br>$b$ – свободный член<br>Весовой коэффициент - $1/x$ |       |  |       |       |      |
| Концентрация, мкг/мл                        |   | 0,02   | 0,06  | 0,30   | 1,20  | 2,40  | 3,00 |
| Внутрисерийная правильность (отн. погр., %) | 1 | 3,33   | -4,72 | -5,28  | -1,19 | -1,56 | 1,41 |
|   | 2 | -3,33  | 0,28  | 0,44   | 2,25  | 0,88  | 3,49 |
|   | 3 | 7,42   | -0,28 | 0,56   | 0,93  | 0,63  | 4,05 |
| Межсерийная правильность (отн. погр., %)    |   | 1,39   | -1,57 | -1,43  | 0,66  | -0,02 | 2,99 |
| Внутрисерийная прецизионность (CV, %)       | 1 | 2,50   | 1,32  | 0,93   | 3,45  | 0,97  | 1,19 |
|   | 2 | 2,67   | 2,21  | 0,69   | 3,97  | 1,19  | 3,58 |
|   | 3 | 1,96   | 0,68  | 0,65   | 0,58  | 0,50  | 3,16 |
| Межсерийная прецизионность (CV, %)          |   | 4,08   | 2,75  | 2,93   | 3,22  | 1,43  | 2,91 |
| Эффект переноса из предыдущей пробы         |   | Перенос аналита не превышал 5,44% от среднего значения площади хроматографического пика МД на хроматограммах образца НПКО, перенос ВС – 0,33% от среднего значения площади хроматографического пика МД-D <sub>3</sub> .  |       |  |       |       |      |
| Эффект разведения (n=6)                     |   | Образец с концентрацией 4,80 мкг/мл  |       | Среднее значение относительной погрешности = 0,21%, CV = 1,78% |       |       |      |
| Эффект матрицы (CV NMF)                     |   | LQC (0,06 мкг/мл)  |       | 0,38%  |       |       |      |
|   |   | HQC (2,40 мкг/мл)  |       | 1,45%  |       |       |      |
| Степень извлечения (MF)                     |   | LQC (0,06 мкг/мл)  |       | 34,12% (CV=1,33%)  |       |       |      |
|   |   | HQC (2,40 мкг/мл)  |       | 40,50% (CV=1,20%)  |       |       |      |

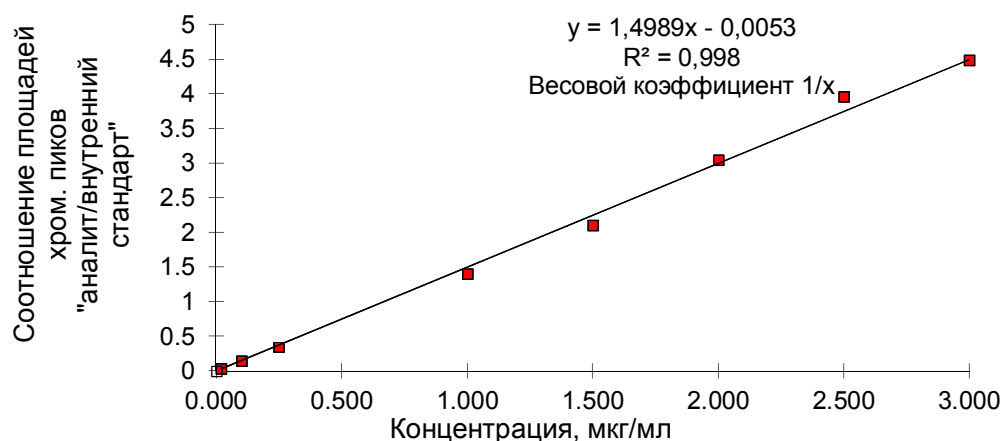


Рисунок 3.33. Пример калибровочной кривой при определении МД методом ВЭЖХ-МС/МС

Таблица 3.24

Результаты оценки долгосрочной стабильности метилдопы в плазме при различных температурных режимах

| № п/п   | Исходные значения | Температура не выше -20°C |              | Исходные значения | Температура не выше -80°C |               |
|---|-------------------|---------------------------|--------------|-------------------|---------------------------|---------------|
|   |                   | 1 мес.                    | 3 мес.       |                   | 1 мес.                    | 3 мес.        |
| образцы КК нижнего уровня концентраций - 0,06 мкг/мл  |                   |                           |              |                   |                           |               |
| 1   | 0,059             | 0,055                     | 0,039        | 0,062             | 0,058                     | 0,060         |
| 2   | 0,056             | 0,055                     | 0,041        | 0,059             | 0,060                     | 0,061         |
| 3   | 0,058             | 0,053                     | 0,037        | 0,059             | 0,057                     | 0,058         |
| 4   | 0,058             | 0,054                     | 0,039        | 0,062             | 0,062                     | 0,061         |
| 5   | 0,058             | 0,055                     | 0,036        | 0,062             | 0,063                     | 0,063         |
| 6   | 0,058             | 0,055                     | 0,038        | 0,063             | 0,061                     | 0,060         |
| Сред. знач.   | 0,058             | 0,054                     | 0,038        | 0,061             | 0,060                     | 0,060         |
| SD  | 0,001             | 0,001                     | 0,002        | 0,002             | 0,002                     | 0,002         |
| CV, %   | 1,63              | 1,12                      | 4,26         | 2,59              | 3,96                      | 2,74          |
| % от номин. конц.                                     | <b>96,22</b>      | <b>90,74</b>              | <b>66,92</b> | <b>101,76</b>     | <b>100,60</b>             | <b>100,76</b> |
| образцы КК верхнего уровня концентраций - 2,40 мкг/мл |                   |                           |              |                   |                           |               |
| 1   | 2,311             | 2,133                     | 1,292        | 2,178             | 2,440                     | 2,070         |
| 2   | 2,305             | 2,035                     | 1,438        | 2,225             | 2,424                     | 2,353         |
| 3   | 2,341             | 2,051                     | 1,377        | 2,273             | 2,313                     | 2,316         |
| 4   | 2,357             | 2,123                     | 1,481        | 2,411             | 2,361                     | 2,178         |
| 5   | 2,357             | 2,038                     | 1,397        | 2,327             | 2,367                     | 2,364         |
| 6   | 2,328             | 2,033                     | 1,459        | 2,278             | 2,368                     | 2,266         |
| Сред. знач.   | 2,333             | 2,069                     | 1,407        | 2,282             | 2,379                     | 2,258         |
| SD  | 0,023             | 0,046                     | 0,068        | 0,081             | 0,046                     | 0,114         |
| CV, %   | 0,97              | 2,24                      | 4,85         | 3,55              | 1,94                      | 5,07          |
| % от номин. конц.                                     | <b>97,22</b>      | <b>86,20</b>              | <b>59,57</b> | <b>95,08</b>      | <b>99,12</b>              | <b>94,08</b>  |

Изучение краткосрочной стабильности при комнатной температуре, стабильности при замораживании/размораживании, стабильности обработанных образцов в автосемплере проводилось на 2 уровнях концентраций: 0,06 мкг/мл (LQC), 2,40 мкг/мл (HQC). При этом метилдопа оставалась в плазме относительно стабильной (Прил. 2, табл. 2).

Долгосрочная стабильность МД в плазме оценивалась при двух температурных режимах: не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  и не выше  $-80^{\circ}\text{C}$ . Как видно из данных, приведённых в табл. 3.24, при температуре хранения не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  аналит остаётся стабильным в течение 1 мес, а при температуре не выше  $-80^{\circ}\text{C}$  - в течение 3 мес, что значительно дольше.

Для установления максимального времени, необходимого для подготовки стабилизированных образцов плазмы после забора крови у добровольца, была изучена стабильность метилдопы в цельной крови без добавления стабилизатора. Испытание проводили на 6 модельных смесях с концентрациями аналита 0,06 мкг/мл и 2,4 мкг/мл. При этом образцы перед обработкой сначала хранили в течение 20 мин на ледяной бане, а затем в течение 40 мин при комнатной температуре. Относительная концентрация МД на уровне 0,06 мкг/мл составила 85,17%, на уровне 2,40 мкг/мл – 94,98%, что отвечало критериям приемлемости.

Таким образом, разработанная методика количественного определения МД в плазме методом ВЭЖХ-МС/МС валидирована по показателям селективность, линейность калибровочной кривой, внутрисерийная и межсерийная прецизионность и правильность, эффект переноса, эффект матрицы, стабильность в соответствии с требованиями нормативной документации [22, 24, 85, 87]. Все валидационные испытания выполнены с добавлением к плазме раствора стабилизатора-антиоксиданта для предотвращения разложения определяемого вещества. Как показало исследование долгосрочной стабильности при различных температурных режимах, образцы, содержащие аналит, целесообразно хранить при температуре не выше  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3. Разработка методики количественного определения мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови**

Выбор параметров масс-спектрометрического детектирования осуществлялся путём непосредственного ввода растворов ДМК и МК в метаноле в концентрации 0,1 мкг/мл в ионный источник с помощью шприцевого насоса. Наибольшая интенсивность аналитического сигнала была достигнута в режиме регистрации положительных ионов.

Масс-спектры, получившиеся в результате фрагментации молекулярных ионов МК и ДМК представлены на рис. 3.34. Дочерний ион 121  $m/z$  получается в результате разрыва углеводородной цепи в молекуле МК, дочерний ион 91  $m/z$  - в результате последующего отщепления метоксигруппы от бензольного кольца, дочерний ион 77  $m/z$  - в результате элиминирования метильной группы от бензольного кольца (рис. 3.35 А). Дочерний ион 65  $m/z$  образуется за счёт перегруппировочного процесса по механизму Мак-Лафферти, что свидетельствует об образовании в ходе распада молекулярного иона МК гидроксифенилкатионов, часть которых в результате кетоенольной таутомерии имеет форму кетона [15, 16]. Фрагментация молекулярного иона ДМК (рис. 3.35 Б) происходит аналогичным образом: дочерний ион 107  $m/z$  также образуется в результате разрыва углеводородной цепи, дочерний ион 77  $m/z$  – вследствие последующего образования фенилкатиона.

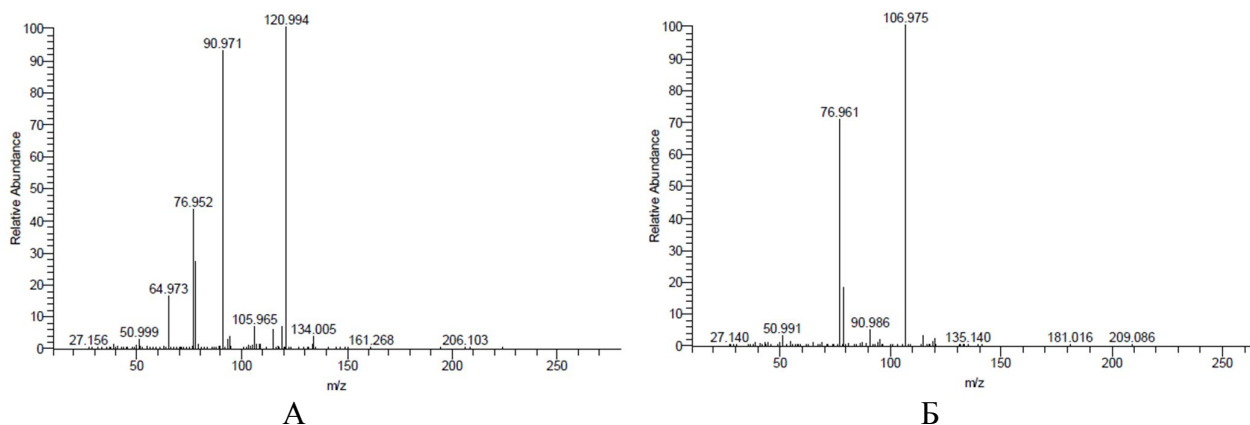


Рисунок 3.34. Масс-спектры молекулярных ионов мебевериновой (А) и деметилированной мебевериновой (Б) кислот

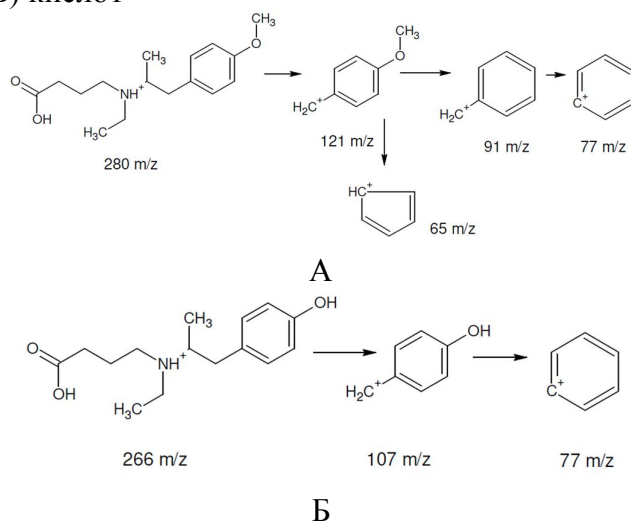


Рисунок 3.35. Схема фрагментации мебевериновой (А) и деметилированной мебевериновой кислот (Б)

В результате фрагментации молекулярных ионов дейтерированных внутренних стандартов МК и ДМК (рис. 3.36) получают аналогичные масс-спектры.

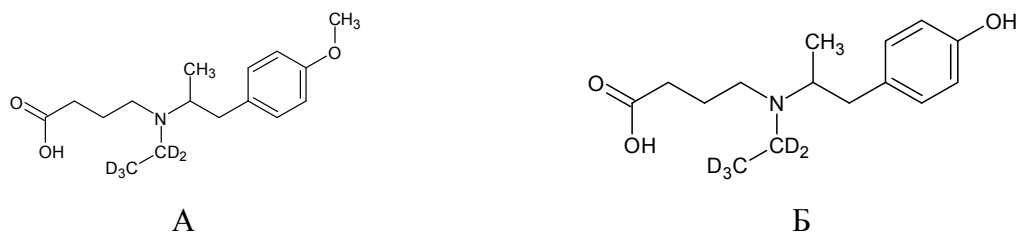


Рисунок 3.36. Структурные формулы дейтерированных внутренних стандартов мебевериновой (А) и деметилированной мебевериновой (Б) кислот

Наилучшая чувствительность достигается при регистрации аналитов по следующим MRM-переходам: для МК - 280→121  $m/z$ , для ДМК – 266→107  $m/z$ . Оптимальные условия масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 3.25. Для детектирования внутренних стандартов выбраны следующие MRM-переходы: МК-D<sub>5</sub> - 285→121  $m/z$ , для ДМК-D<sub>5</sub> - 271→107  $m/z$ .

Таблица 3.25

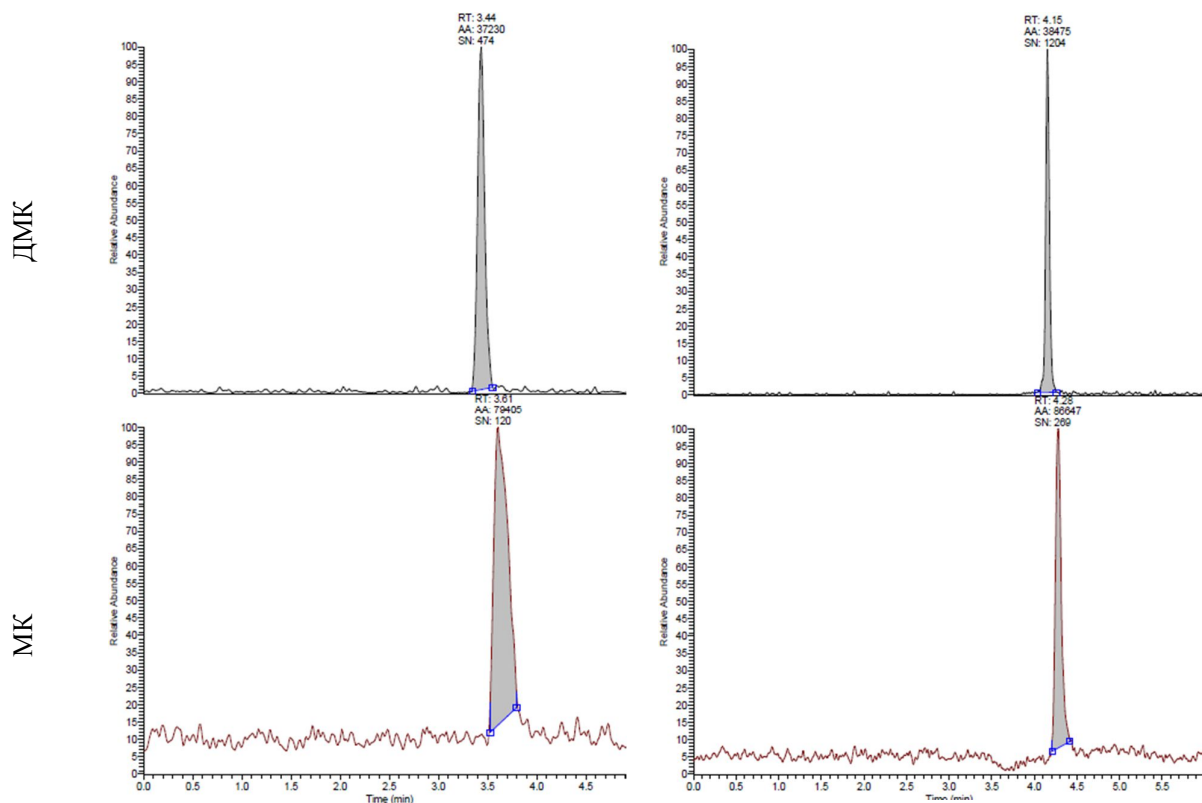
Параметры масс-спектрометрического МК и ДМК

| Параметр                     | Значение     |
|------------------------------|--------------|
| Напряжение электроспрея      | 3000 В       |
| Температура капилляра        | 200 °С       |
| Осушающий газ                | 40 arb. unit |
| Вспомогательный газ          | 5 arb. unit  |
| Температура испарителя       | 380 °С       |
| Давление в ячейке соударения | 1,5 мТорр    |

Подбор условий хроматографического разделения мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот осуществлялся при следующих параметрах: колонка Luna C8 (150\*4,6 мм, 5 мкм), скорость потока - 0,4 мл/мин; комнатная температура; ПФ – метанол: ацетонитрил : вода : водный раствор формиата аммония в концентрации 80 ммоль/мл (рН=3,5) в соотношении 50:20:20:10 (об/об/об/об) (рис. 3.37 А).

Применение двумерной хроматографии с использованием второй колонки Luna C<sub>8</sub> Mercury (20\*4,0 мм, 5 мкм) на основе октилсиликагеля позволило значительно увеличить соотношение «сигнал/шум» за счёт уменьшения дрейфа базовой линии (рис 3.37 Б). Поток подвижной фазы до 0,25 мин с колонки Luna C<sub>8</sub> Mercury (20\*4,0 мм, 5 мкм) (колонка №1) направлялся на слив, с 0,25 мин до 0,75 мин - с колонки №1 направлялся на колонку Luna C8 (150\*4,6 мм, 5 мкм) (колонка №2), 0,75 мин до конца анализа - с колонки №1 направляется на слив, а с колонки №2 – в масс-спектрометрический детектор

(рис. 3.30). Анализ выполнялся при комнатной температуре в течение 6 мин. Параметры градиентного элюирования представлены в табл. 3.26 [40, 108, 110].



|     | S пика | S/N | S пика | S/N  |
|-----|--------|-----|--------|------|
| ДМК | 37232  | 474 | 38475  | 1204 |
| МК  | 79405  | 120 | 86647  | 269  |
|     | А      |     | Б      |      |

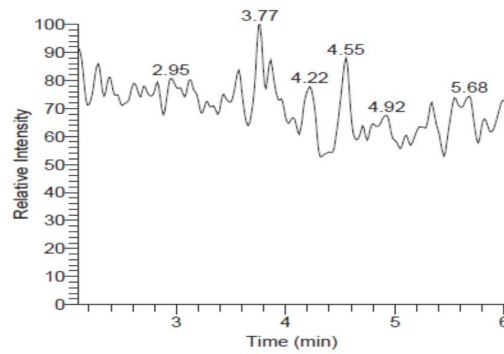
Рисунок 3.37. Примеры хроматограмм МК и ДМК, полученных с использованием одной колонки Luna C8 (150\*4,6 мм, 5 мкм) (А) и применением двумерной хроматографии (Б)

Таблица 3.26

Параметры градиентного элюирования при определении мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот

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

При анализе раствора фенольного глюкуроида деметилированной мебевериновой кислоты (ФГДМК) в метаноле в концентрации 2000 нг/мл при данных условиях его разложение в источнике ионов до ДМК не наблюдалось (рис. 3.38).



266→107 m/z

Рисунок 3.38. Хроматограмма раствора фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты в метаноле

Таким образом, применение двумерной хроматографии является наиболее оптимальным для анализа МК и ДМК благодаря увеличению соотношения «сигнал/шум» при детектировании аналитов: для ДМК - в 3 раза, для МК – в 2 раза. Так же при использовании данных условий анализа отсутствует фрагментация ФГМДК в источнике ионов.

Для пробоподготовки было выбрано осаждение белков. При этом к 100 мкл плазмы, добавляли 400 мкл раствора дейтерированных стандартов МК-D<sub>5</sub> и ДМК-D<sub>5</sub> с концентрациями 400,0 нг/мл в метаноле. Полученную смесь перемешивали на вортексе в течение 30 сек, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин. Объем вводимой пробы составил 5 мкл [35, 108, 110].

### ***3.3.1. Предварительное изучение стабильности деметилированной мебевериновой кислоты в плазме и обратной конверсии её фенольного глюкуронида***

Предварительное изучение стабильности деметилированной мебевериновой кислоты проводилось в образцах плазмы, содержащих К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития в качестве антикоагулянтов, на уровне концентрации 1600 нг/мл. Расчёт концентрации ДМК на данном этапе проводился методом внешнего стандарта. Результаты, полученные после 24 ч хранения модельных смесей при комнатной температуре и 3 циклов замораживания/размораживания отвечают критериям приемлемости (табл. 3.27): значения относительной концентрации ДМК укладываются в диапазон от 85,0% до 115,0%. Следовательно, добавление растворов антиоксидантов не требуется.

## Предварительная оценка стабильности ДМК в плазме крови

| № п/п     | Краткосрочная стабильность (24 ч. при комнатной температуре), % от начальной концентрации |                 | Стабильность при замораживании/размораживании, % от начальной концентрации |                 |
|-----------|---|-----------------|--|-----------------|
|           | К <sub>3</sub> ЭДТА   | Гепаринат лития | К <sub>3</sub> ЭДТА  | Гепаринат лития |
| 1         | 102,3   | 98,7            | 93,4   | 101,1           |
| 2         | 94,2  | 102,6           | 101,2  | 95,9            |
| 3         | 101,2   | 105,1           | 103,1  | 94,1            |
| Ср. знач. | 99,2  | 102,1           | 99,2   | 97,0            |

Оценка обратной конверсии фенольного глюкуронида ДМК проводилась в образцах плазмы в течение 24 ч хранения при комнатной температуре и 3 циклов заморозки/разморозки с использованием К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития в качестве антикоагулянтов. Из-за отсутствия данных литературы о фармакокинетических параметрах данного метаболита для исследования была выбрана концентрация 2000 нг/мл с учётом его полного гидролиза. При этом из приготовленных модельных смесей отбирались аликвоты объёмом 100 мкл для последующего анализа сразу после приготовления и через 24 ч после приготовления. Затем осуществлялось сравнение площадей хроматографических пиков ДМК, образовавшейся в результате гидролиза глюкуронида, с площадью хроматографических пиков ДМК на уровне концентраций 10 нг/мл (табл. 3.28). Так же была выполнена оценка обратной конверсии ФГДМК в депротеинизате после 24 ч хранения в автосемплере.

Таблица 3.28

## Влияние антикоагулянтов на процесс обратной конверсии фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты

|  | Антикоагулянт       |                          |                 |                          |
|--|---------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|
|  | К <sub>3</sub> ЭДТА |                          | Гепаринат лития |                          |
|  | S пика, ЕД*с        | % от S пика образца НПКО | S пика, ЕД*с    | % от S пика образца НПКО |
| Средняя S пика ДМК в образце 10 нг/мл (n=6)  | 98282               | -                        | 95153           | -                        |
| Начальное значение S пика ДМК в образце ФГДМК (n=6)                                  | 0                   | 0                        | 0               | 0                        |
| Значение S пика ДМК в образце ФГДМК после 3 циклов заморозки/разморозки (n=6)        | 0                   | 0                        | 0               | 0                        |
| Значение S пика ДМК в образце ФГДМК после 24 ч. хранения при комн. температуре (n=6) | 0                   | 0                        | 0               | 0                        |
| Значение S пика ДМК в депротеинизате образца ФГДМК после 24 ч. в автосемплере (n=6)  | 0                   | 0                        | 0               | 0                        |

Таким образом, при использовании обоих антикоагулянтов гидролиз ФГДМК отсутствовал в течение 24 ч хранения образцов плазмы при комнатной температуре, 3



циклов заморозки / разморозки, а также в течение 24 ч хранения обработанных образцов в автосеплере. Следовательно, добавление буферных растворов для его стабилизации не требуется. Для дальнейших исследований был выбран К<sub>3</sub>ЭДТА, т.к. этот антикоагулянт в нашей лаборатории и клиническом центре наиболее часто применяется для биоаналитических исследований других соединений [108].

### 3.3.2. Валидация ВЭЖХ-МС/МС-методики определения мебевериновой и демитилированной мебевериновой кислот в плазме

Аналитический диапазон методики определения МК и ДМК составил 10,0 – 2000,0 нг/мл. Калибровочные кривые содержали 8 калибровочных концентраций: 10,0, 50,0, 200,0, 500,0, 750,0, 1000,0, 1500,0, 2000,0 нг/мл. Подтверждение внутрисерийной и межсерийной прецизионности и правильности выполнялось на шести уровнях концентраций: 10,0, 30,0, 400,0, 800,0, 1600,0 2000,0 нг/мл. Результаты валидации методики представлены в табл. 3.28, 3.29 [35, 108, 110].

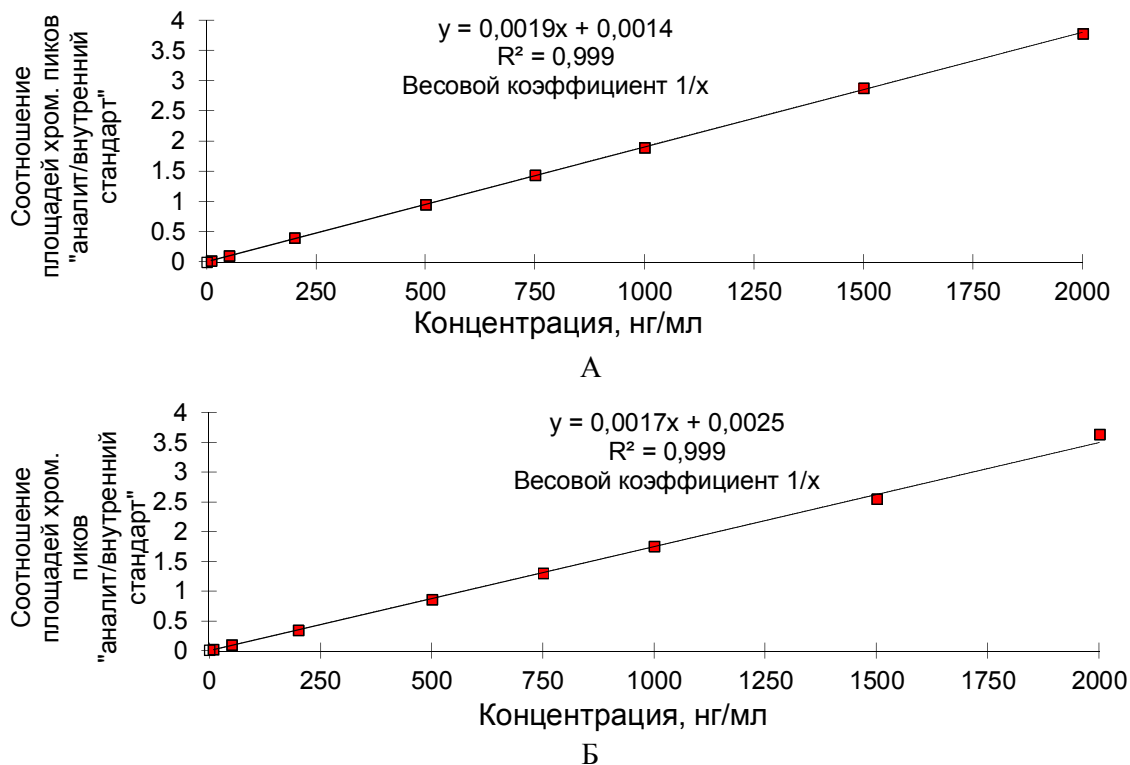


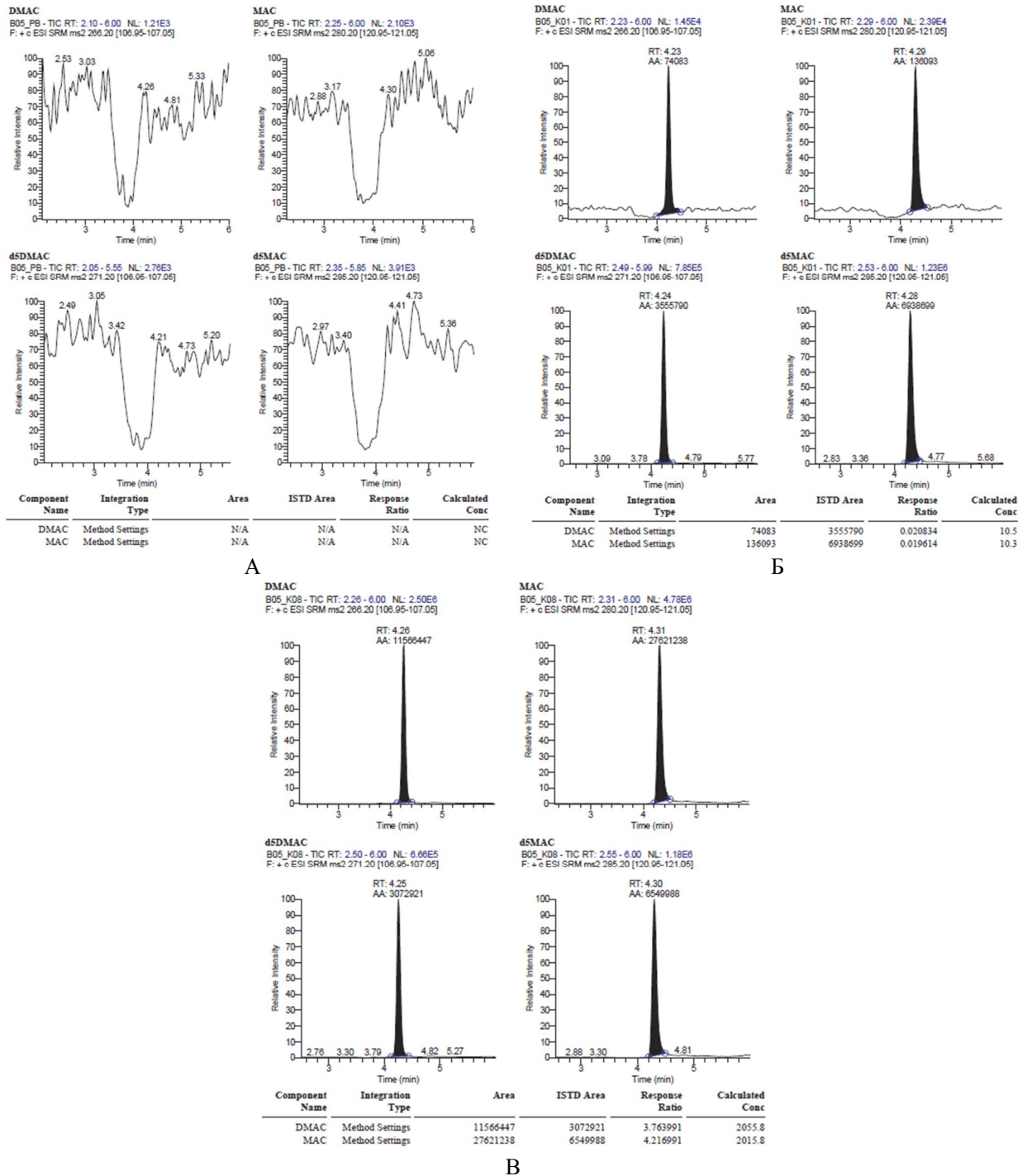
Рисунок 3.39. Примеры калибровочных кривых при определении МК (А) и ДМК (Б) методом ВЭЖХ-МС/МС

Результаты валидации ВЭЖХ-МС/МС-методики определения мебевериновой кислоты в плазме

| Параметр                                    | Результат   |        |   |       |       |       |       |
|---|---|--------|---|-------|-------|-------|-------|
| Селективность                               | Хроматографические пики эндогенных соединений в области времени удерживания определяемых веществ и изотопномеченных стандартов на хроматограммах холостых образцов отсутствовали (рис. 3.40)  |        |   |       |       |       |       |
| Калибровочная кривая                        | <p>Линейная зависимость, полученная с помощью взвешенного метода наименьших квадратов (рис.3.39, Прил.1, табл. 5): уравнение <math>y = a \cdot x + b</math>, где:</p> <p>x – концентрация МК в плазме, мкг/мл;<br/> y – соотношение площадей хроматографических пиков «МК/МК-D<sub>5</sub>»<br/> a – угловой коэффициент<br/> b – свободный член<br/> Весовой коэффициент - 1/x</p> |        |   |       |       |       |       |
| Концентрация, нг/мл                         | 10  | 30     | 400   | 800   | 1600  | 2000  |       |
| Внутрисерийная правильность (отн. погр., %) | 1   | 14,18  | 11,71   | 5,72  | 7,08  | 4,20  | 5,61  |
|   | 2   | -14,56 | 5,64  | 13,86 | 10,41 | 12,95 | 12,79 |
|   | 3   | 4,57   | -1,92   | 2,68  | -1,38 | -0,39 | 0,05  |
| Межсерийная правильность (отн. погр., %)    | 1,39  | 5,17   | 7,42  | 5,37  | 5,59  | 6,15  |       |
| Внутрисерийная прецизионность (CV, %)       | 1   | 7,09   | 3,08  | 8,23  | 7,74  | 8,00  | 4,35  |
|   | 2   | 7,10   | 2,19  | 4,41  | 1,65  | 1,71  | 2,77  |
|   | 3   | 14,96  | 5,89  | 6,35  | 1,75  | 1,40  | 4,88  |
| Межсерийная прецизионность                  | 15,75   | 6,55   | 7,55  | 6,59  | 6,99  | 6,31  |       |
| Эффект переноса из предыдущей пробы         | Отсутствует   |        |   |       |       |       |       |
| Эффект разведения (n=6)                     | Образец с концентрацией 3200 нг/мл  |        | Среднее значение относительной погрешности = 12,23% %, CV = 1,56% |       |       |       |       |
| Эффект матрицы (CV NMF)                     | LQC (30 нг/мл)  |        | 2,24%   |       |       |       |       |
|   | HQC (1600 нг/мл)  |        | 3,23%   |       |       |       |       |
| Степень извлечения (MF)                     | LQC (30 нг/мл)  |        | 91,48% (CV=5,43%)   |       |       |       |       |
|   | HQC (1600 нг/мл)  |        | 88,03% (CV=5,94%)   |       |       |       |       |

Результаты валидации ВЭЖХ-МС/МС-методики определения деметилированной мебе-  
вериновой кислоты в плазме

| Параметр                                    | Результат  |  |       |       |       |       |       |
|---|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Селективность                               | Хроматографические пики эндогенных соединений в области времени удерживания определяемых веществ и изотопномеченных стандартов на хроматограммах холостых образцов отсутствовали (рис. 3.40)   |  |       |       |       |       |       |
| Калибровочная кривая                        | <p>Линейная зависимость, полученная с помощью взвешенного метода наименьших квадратов (рис. 3.39, Прил.1, табл. 5): уравнение <math>y = a \cdot x + b</math>, где:</p> <p><math>x</math> – концентрация ДМК в плазме, мкг/мл;<br/> <math>y</math> – соотношение площадей хроматографических пиков «ДМК/ДМК-D<sub>5</sub>»<br/> <math>a</math> – угловой коэффициент<br/> <math>b</math> – свободный член<br/>           Весовой коэффициент - <math>1/x</math></p> |  |       |       |       |       |       |
| Концентрация, нг/мл                         | 10   | 30   | 400   | 800   | 1600  | 2000  |       |
| Внутрисерийная правильность (отн. погр., %) | 1  | 18,78  | 10,70 | 0,09  | 2,26  | -1,54 | 1,56  |
|   | 2  | 7,00   | 11,63 | 13,43 | 10,17 | 12,59 | 13,04 |
|   | 3  | -1,03  | 9,08  | 12,19 | 11,84 | 13,77 | 12,46 |
| Межсерийная правильность (отн. погр., %)    | 8,22   | 10,48  | 8,57  | 8,09  | 8,27  | 9,02  |       |
| Внутрисерийная прецизионность (CV, %)       | 1  | 5,00   | 4,39  | 6,89  | 7,56  | 8,58  | 3,15  |
|   | 2  | 6,20   | 1,91  | 4,30  | 2,38  | 1,18  | 2,16  |
|   | 3  | 5,88   | 5,35  | 4,91  | 2,48  | 2,53  | 3,96  |
| Межсерийная прецизионность                  | 9,34   | 4,01   | 7,61  | 5,87  | 8,01  | 5,81  |       |
| Эффект переноса из предыдущей пробы         | Отсутствует  |  |       |       |       |       |       |
| Эффект разведения (n=6)                     | Образец с концентрацией 3200 нг/мл   | Среднее значение относительной погрешности = 110,58%, CV = 2,51% |       |       |       |       |       |
| Эффект матрицы (CV NMF)                     | LQC (30 нг/мл)   | 2,95%  |       |       |       |       |       |
|   | HQC (1600 нг/мл)   | 2,89%  |       |       |       |       |       |
| Степень извлечения (MF)                     | LQC (30 нг/мл)   | 91,98% (CV=5,43%)  |       |       |       |       |       |
|   | HQC (1600 нг/мл)   | 86,76% (CV=1,86%)  |       |       |       |       |       |



DMAC – деметилированная мебевериновая кислота (266→107 m/z); MAC - мебевериновая кислота (280→121 m/z); d5DMAC – внутренний стандарт ДМК-D<sub>5</sub>- (271→107 m/z); d5MAC – внутренний стандарт МК-D<sub>5</sub>- (285→121 m/z)

Рисунок 3.40. Пример хроматограммы холостого образца (А) и образца с концентрациями МК и ДМК на уровне 10 нг/мл (Б) и 2000 нг/мл (В)

Краткосрочная стабильность при комнатной температуре, стабильность в течение 3 циклов замораживания/размораживания, стабильность обработанных образцов в пробоотборнике, долгосрочная стабильность оценивались на 2 уровнях концентраций, оди-

наковых для обоих аналитов: 30 нг/мл (LQC), 1600 нг/мл (HQC). При этом полученные значения концентраций МК и ДМК свидетельствуют о достаточной стабильности данных веществ в  $K_3$ ЭДТА-плазме (Прил. 2, табл. 3, 4): относительное содержание определяемых веществ находилось в диапазоне 85,00% до 115,00%. Выбранный режим хранения образцов при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  позволяет хранить образцы в течение 3 мес.

Таким образом, методика количественного определения мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови с помощью ВЭЖХ-МС/МС соответствует требованиям, предъявляемым к валидации биоаналитических методик [22, 24, 85, 87]. Диапазон определения обоих аналитов составил 10,0 – 2000,0 нг/мл. На этапе разработки было выполнено предварительное изучение стабильности ДМК, содержащего в структуре один фенольный гидроксил, которое показало стабильность данного соединения, в образцах плазмы в течение 24 ч при комнатной температуре и 3 циклов заморозки/разморозки. Обратная конверсия фенольного глюкуронида ДМК в процессе хранения модельных смесей плазмы при комнатной температуре, а также в процессе проведения анализов (фрагментация в источнике ионов) полностью отсутствовала. Режим заморозки до температуры не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  обеспечивает сохранность обоих аналитов в образцах в течение 3 мес.

#### **3.4. Подходы к разработке методик количественного определению веществ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и образующих в процессе метаболизма глюкурониды, в плазме**

Анализ литературных данных показал, что для микофеноловой и деметилированной мебевериновой кислот и метилдопы не требуется добавление растворов антиоксидантов к образцам биологических жидкостей [45, 48, 49, 50, 51, 53, 56, 60, 62, 65, 67, 70, 74, 75, 77, 92, 94, 105, 115, 116, 123, 126, 128, 131, 136- 138, 143, 145, 149, 155, 157, 160, 165, 166, 172 , 174, 177, 178, 188]. Однако, результаты проведённого исследования показали, что молекула МД, содержащие в структуре два фенольных гидроксила, в плазме крови достаточно быстро окисляется и для её стабилизации необходимо добавление раствора антиоксиданта. МФК и ДМК способны образовывать конъюгаты с глюкуроновой кислотой. Результаты биоаналитических исследований МФК, в которых проводилось исследование обратной конверсии и стабильности ФГМФК и АГМФК, как было

отмечено выше, различаются (см. п. 1.1.3). Данные о стабильности фенольного глюкуронида ДМК не были опубликованы.

На начальном этапе разработки методики для количественного определения ЛВ, образующих нестабильные метаболиты (глюкурониды и другие конъюгаты, N-оксиды, сложные эфиры, лактоны), а также для совместного определения веществ, содержащих сложноэфирную и лактонную группы, вместе с их кислотными формами, необходимо оценить влияние фрагментации данных соединений в источнике ионов на результаты определения аналита. При наличии обратного преобразования метаболита в исходное анализируемое вещество и их одинаковых временах удерживания требуется либо внести изменения в хроматографическую программу для разделения данных веществ, либо выбрать более мягкие условия ионизации (снижение напряжения капилляра электро-спрея и температуры в источнике ионов)[15, 16, 26, 40, 92, 118, 165]. Так, при ВЭЖХ-МС/МС-определении МФК были изменены условия градиентного элюирования (см. п. 3.1.1). Использование более длинной хроматографической колонки и подкисление подвижной фазы 0,1% раствором муравьиной кислоты в ВЭЖХ-МС-методе измерения концентрации данного соединения позволили достигнуть хроматографического разделения аналита и ФГМФК (см. п. 3.1.2). Применение жидкостно-жидкостной экстракции в качестве метода пробоподготовки при ГХ-МС-определении МФК не позволяет проводить извлечение глюкуронидов, что препятствует их попаданию в экстракт и вводу в хроматографическую систему.

После выбора окончательных условий подготовки проб и хромато-масс-спектрометрического определения следует осуществить подбор антикоагулянта на основании изучения краткосрочной стабильности и стабильности при заморозке/разморозке определяемого вещества. Так, МФК и ДМК, содержащие в структуре один фенольный гидроксил, оставались стабильными в плазме, содержащей  $K_3ЭДТА$  и гепаринат лития, после 24 ч хранения при комнатной температуре, а также 3 циклов заморозки/разморозки (табл. 3.4, 3.27). Метилдопа окислялась в течение 2,5 ч хранения с использованием обоих антикоагулянтов. Кроме того, концентрация данного соединения в плазме опускалась ниже допустимого уровня после 16 ч хранения при температуре не выше  $-20^{\circ}C$  (табл. 3.21), что указывало на необходимость добавления растворов антиоксидантов.

Изучение стабильности фенольного глюкуронида МФК показало, что при выборе значения НПКО 0,5 мкг/мл, уровень обратной конверсии данного соединения в течение 24 ч хранения при комнатной температуре при использовании К<sub>3</sub>ЭДТА в качестве антикоагулянта 2,58 % от площади хроматографического пика образца НПКО, что в 3 раза меньше, чем в случае использования гепарината лития (табл. 3.5). При выборе более низкого значения НПКО 0,05 мкг/мл при применении К<sub>3</sub>ЭДТА гидролиз ФГМФК не превышал максимально допустимого уровня в течение 6 ч, что в 3 раза дольше, чем при добавлении к плазме гепарината лития (табл. 3.8). Разложение ФГМФК в К<sub>3</sub>ЭДТА-плазме после трёх циклов заморозки/разморозки, в депротеинизате плазмы в течение 24 ч хранения в пробоотборнике, а также в течение 1 мес хранения при температуре не выше -20°C полностью отсутствовало (табл. 3.9). Обратная конверсия ФГМФК, а также минорного метаболита АГМФК оценивалась путём повторного анализа образцов, полученных от крыс (табл. 3.10): различия между начальным и конечным значениями концентраций МФК варьировали от -3,42 до 9,49%, что полностью отвечает критериям приемлемости. Поэтому антикоагулянт К<sub>3</sub>ЭДТА целесообразно использовать при биоаналитических исследованиях микофеноловой кислоты. Таким образом, результаты изучения обратной конверсии метаболитов МФК совпадают с результатами [92], и расходятся с данными более ранних публикаций [50, 56, 65, 128, 137, 157, 174].

Обратная конверсия конъюгата ДМК не наблюдалась при проведении испытаний с обоими антикоагулянтами (табл. 3.28). Для дальнейших исследований был выбран К<sub>3</sub>ЭДТА, т.к. данный антикоагулянт наиболее часто используется при проведении биоаналитических исследований в нашей лаборатории и клиническом центре. Наличие гидролиза ФГМФК можно объяснить согласованным влиянием электронодонорного заместителя – метоксигруппы и электроноакцепторного заместителя – сложноэфирной группы, создающим дефицит электронов в положении С-4 1,3-дигидро-2-бензофуранового цикла (рис. 3.41). Это уменьшает электронную плотность в области гликозидной связи и увеличивает её реакционную способность в реакциях гидролиза, протекающих по механизму нуклеофильного замещения (S<sub>N</sub>).

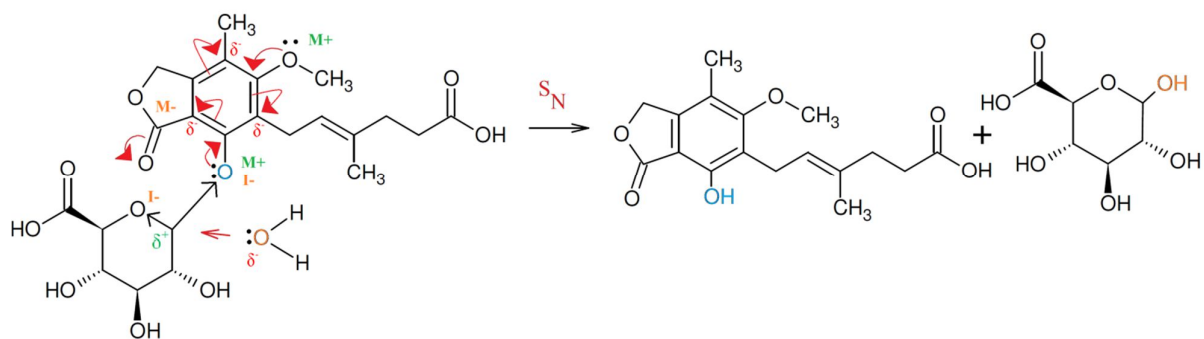


Рисунок 3.41. Схема гидролиза фенольного глюкуронида микрофеноловой кислоты

В молекуле ФГДМК заместители, вступающие в сопряжение с бензольным кольцом, отсутствуют, а положительный индуктивный эффект алифатической углеводородной цепочки не оказывает значительного влияния на увеличение электронной плотности в бензольном кольце.

Таким образом, добавления раствора стабилизатора для предотвращения гидролиза фенольных глюкуронидов МФК и ДМК не требуется.

Таблица 3.31

#### Основные способы стабилизации аналитов в биологических жидкостях

| Группа веществ                 | Способ стабилизации   | Примеры   |
|--------------------------------|---|---|
| Легкоокисляющиеся соединения   | Добавление антиоксидантов (растворов аскорбиновой кислоты, натрия метабисульфита и др.)                   | допамин [168], тетрагидробиоптерин [164]  |
|                                | Дериватизация   | метаболиз прасугрела R-138727 [176], омапатрилат [99], каптоприл [44, 63, 76]                               |
|                                | Хранение при температуре не выше $-70^{\circ}\text{C}$  | 4 $\beta$ -гидроксихолестерол [167]   |
| N-оксиды                       | Добавление антиоксидантов   | хлорпротиксен [71]  |
| Светочувствительные соединения | Хранение в светонепроницаемой таре, использование источников освещения, не выделяющих свет в УФ-диапазоне | витамин D, нифедипин, бендрофлуметиазид [118], монтелукаст [104]  |
| Глюкурониды                    | Коррекция pH биологической пробы до значений ниже 6,0   | телмисартан, диклофенак [71, 73]  |
| Сложные эфиры                  | Коррекция pH, использование ингибиторов эстераз (фторида натрия, параоксона, эсерина и др.)               | осельтамивир [120], селективный ингибитор аденозина 2А В-068645 [184], ацетилсалициловая кислота [112, 159] |
| Лактоны                        |   | статины [96, 100, 118, 133, 141, 142]   |
| Стереоизомеры                  | Создание сильнокислой pH среды  | оксазепам [146], росиглитазон и пиоглитазон [98]  |
|                                | Добавление раствора аскорбиновой кислоты и N-этилмалеимида  | региноевая кислота [173]  |

В случае отсутствия разложения аналита и отсутствия значимой обратной конверсии его нестабильных метаболитов после подбора антикоагулянта следует переходить к валидации разработанной методики. В случае нестабильности исследуемого вещества



необходимо осуществить подбор комбинации раствора стабилизатора и антикоагулянта. Так как главной причиной деградации двуатомных фенольных соединений является окисление [26, 40, 118], в ходе оптимизации условий хранения метилдопы в плазме были использованы растворы восстановителей: аскорбиновой кислоты, натрия тиосульфата, натрия метабисульфита, натрия сульфита, а также смеси аскорбиновой кислоты, натрия гидрокарбоната, натрия сульфита. При разработке методики для анализа нестабильных соединений из других химических групп, выбор способа стабилизации необходимо проводить исходя из основной причины разложения (табл. 3.31).

Выбор комбинации антиоксиданта и антикоагулянта для предотвращения разложения метилдопы был выполнен при объёмном соотношении 1:5 «раствор антиоксиданта/плазма». При данном соотношении применение растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 5 и 10% в комбинации с  $K_3$ ЭДТА позволило предотвратить окисление МД в течение 24 ч хранения при комнатной температуре, а также в течение 3-х циклов замораживания/размораживания. Испытания с использованием раствора, содержащего смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, в комбинации с  $K_3$ ЭДТА позволили повысить чувствительность методики, а также повысить стабильность самого раствора антиоксиданта. Поэтому данный стабилизатор был выбран для дальнейших испытаний. Добавление растворов натрия тиосульфата и натрия метабисульфита в более концентрированных соотношениях «раствор антиоксиданта/плазма» (1:2 или 1:1), а также в более высоких концентрациях не проводилось, т.к. избыточное количество соли в пробе приводит к быстрому загрязнению хроматографической колонки и иглы электроспрея в источнике ионов [152].

Предотвращение разложения метилдопы с применением именно  $K_3$ ЭДТА в качестве антикоагулянта можно объяснить тем, что основными катализаторами окисления её молекулы являются ионы магния, меди и железа [127], которые присутствуют в плазме крови. Этилендиаминтетраацетат, являясь поливалентным лигандом, образует с этими ионами хелатные комплексные соединения и препятствует тем самым ускорению данного процесса.

После завершения этапа разработки необходимо провести валидацию методики с использованием плазмы с добавлением выбранного антикоагулянта / комбинации антикоагулянта и стабилизатора. В случае работы с нестабильными соединениями целесооб-

разно проводить исследование долгосрочной стабильности при нескольких температурных режимах. Так, применение глубокой заморозки до температуры не выше  $-80^{\circ}\text{C}$  позволило увеличить срок хранения образцов, содержащих метилдопу, до 3 мес (табл. 3.24). При исследовании 4 $\beta$ -гидроксихолестерола [167] авторам также удалось достичь более продолжительного срока хранения образцов плазмы при температуре не выше  $-80^{\circ}\text{C}$ , по сравнению с температурой не выше  $-20^{\circ}\text{C}$ . Однако, данное соединение является относительно стабильным при комнатной температуре в  $\text{K}_3\text{ЭДТА}$ -плазме.

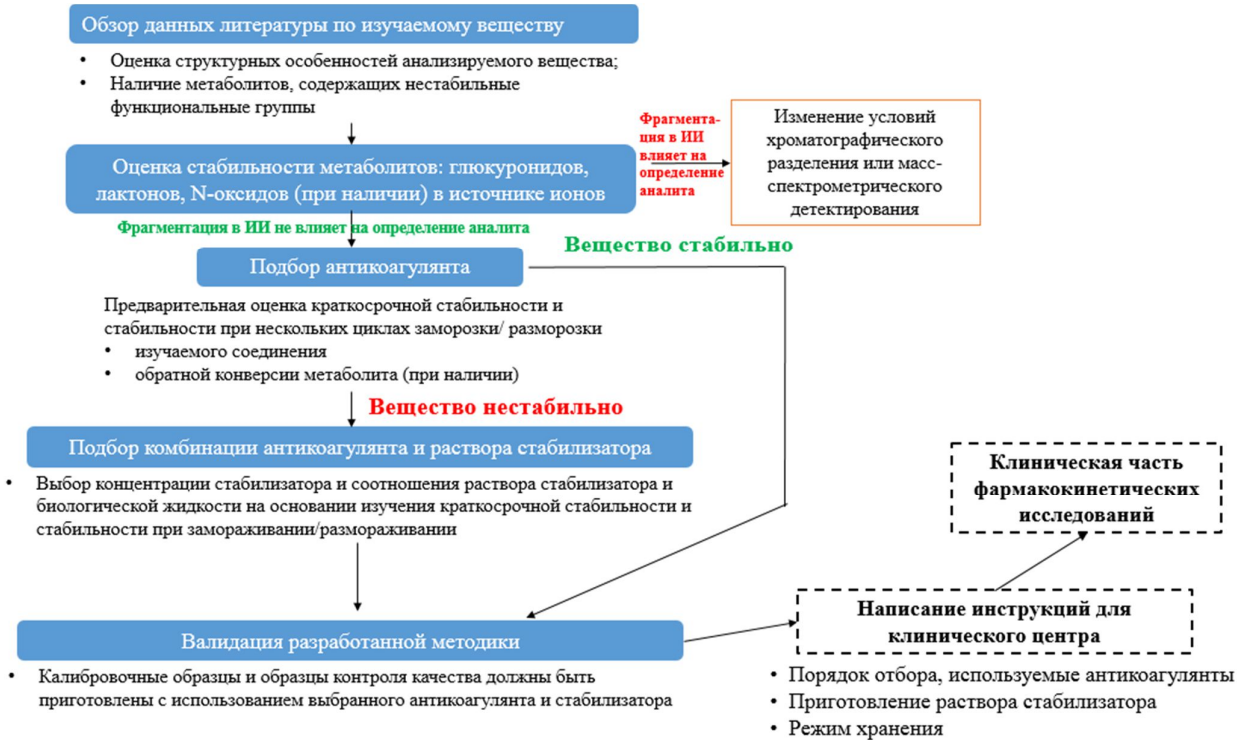


Рисунок 3.42. Подходы к разработке биоаналитической методики для определения веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы или образующих нестабильные метаболиты

Таким образом, при проведении биоаналитических исследований веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы или образующих нестабильные метаболиты, выбор условий хранения образцов необходимо начинать подбора с антикоагулянта. При этом нужно провести предварительное изучение краткосрочной стабильности и стабильности при замораживании/размораживании изучаемых веществ. В случае получения неудовлетворительного результата следует осуществить выбор комбинации антикоагулянта и раствора стабилизатора, а также концентрации данного раствора и его соотношения с биологической жидкостью. После этого можно переходить к

этапу валидации методики с выбранным антикоагулянтом или комбинацией антикоагулянта и стабилизатора (рис. 3.42) [107, 108].

При разработке методики для определения ЛВ, метаболизирующихся путём глюкоуровой конъюгации, необходимо предотвратить влияние разложения данных групп соединений в источнике ионов на результаты определения аналита во избежание получения ложных результатов измерений. Данные меры также следует применять при биоаналитических исследованиях веществ, образующих такие нестабильные метаболиты, как N-оксиды, S-оксиды, сульфаты, сложные эфиры, лактоны, а также при совместном измерении концентрации сложных эфиров и лактонов с их кислотными формами [107, 108].

#### **Выводы по главе**

1. Разработаны оптимальные условия пробоподготовки и хромато-масс-спектрометрического определения микофеноловой кислоты методами ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС, метилдопы методом ВЭЖХ-МС/МС и мебеверинового и деметилированного мебеверинового кислот методом ВЭЖХ-МС/МС.
2. Молекула микофеноловой кислоты, содержащая в структуре один фенольный гидроксил, является устойчивой к окислению при хранении образцов плазмы крови. Установлено, что при выборе НПКО методики 0,5 мкг/мл при использовании  $K_3$ ЭДТА в качестве антикоагулянта уровень обратной конверсии ФГМФК остаётся на допустимом уровне в течение 24 ч хранения при комнатной температуре, при выборе НПКО методики 0,05 мкг/мл - в течение 6 ч хранения при комнатной температуре. Результаты повторного анализа образцов, полученных от нелинейных крыс, имеют высокую степень сходимости с первоначальными данными. Поэтому добавление раствора стабилизатора не требуется.
3. Для предотвращения окисления метилдопы, содержащей в структуре два фенольных гидроксила, к  $K_3$ ЭДТА-плазме необходимо добавлять водный раствор, содержащий смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия гидрокарбоната в концентрациях 5%, 0,2% и 2,4%, соответственно, из расчёта 0,2 мл раствора стабилизатора на 1 мл плазмы крови.
4. Молекула деметилированного мебеверинового кислоты, содержащая в структуре один фенольный гидроксил, также является стабильной при хранении в образцах плазмы.

Обратная конверсия фенольного глюкуронида ДМК отсутствует при использовании обоих антикоагулянтов.

5. Результаты валидации подтверждают пригодность разработанных методик для проведения биоаналитических исследований.
6. Разработанные методики определения МФК в плазме крови методами ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС и ГХ-МС имеют высокий уровень сходимости результатов.
7. На примере биоаналитических исследований микофеноловой кислоты, метаболитов мебеверина и метилдопы выявлен алгоритм разработки методик определения в плазме веществ, содержащих нестабильные функциональные группы и образующих нестабильные метаболиты. Данный алгоритм возможно применять как при проведении фармакокинетических исследований лекарственных препаратов, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и образующих в процессе метаболизма глюкурониды, так и для других групп нестабильных соединений.

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биоаналитический этап является основным при проведении фармакокинетических исследований. Результаты данного этапа играют важную роль при регистрации воспроизведённых препаратов. Поэтому аналитическая методика, а также рекомендации по отбору и хранению проб должны быть разработаны заблаговременно до начала КИ и соответствовать всем установленным требованиям [22, 24, 85, 87]. После забора образцов у добровольцев в ходе клинической части выполняется их транспортировка в лабораторию, где в последствии проводят количественное определение изучаемых веществ. Затем осуществляют статистическую обработку полученных результатов и делают вывод о результатах проведенного исследования.

### 4.1. Результаты исследования биоэквивалентности микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой, с применением ВЭЖХ-МС/МС

Согласно результатам проведённых испытаний отбор проб крови осуществлялся в вакуумные пробирки, содержащие  $K_3ЭДТА$  в качестве антикоагулянта. Затем данные пробирки плавно переворачивали 4-5 раз, во избежание образования сгустка и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 2500 об/мин. Время от момента забора крови до начала центрифугирования составляло не более 15 мин. Далее, пробирки с плазмой замораживались до температуры не выше  $-20^{\circ}C$ . После разморозки образцов пробоподготовка осуществлялась не позднее, чем через 6 ч (см. п. 3.1.2). Измерение концентрации МФК согласно требованиям протокола исследования было выполнено с помощью ВЭЖХ-МС/МС метода (см. п. 3.1.1) Всего было проанализировано всего было проанализировано 1536 образцов.

Таблица 4.1

Фармакокинетические параметры микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма тестируемого препарата

| № добровольца | $C_{max}$ ,<br>мкг/мл | $T_{max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t}$ ,<br>мкг·ч/мл | $C_{max}/AUC_{0-t}$ ,<br>ч <sup>-1</sup> |
|---------------|-----------------------|------------------|---------------------------|--|
| 1             | 21,55                 | 1,5              | 18,16                     | 1,1868                                   |
| 2             | 29,31                 | 1,5              | 31,22                     | 0,9389                                   |
| 3             | 25,91                 | 1,5              | 29,15                     | 0,8889                                   |
| 4             | 17,02                 | 1,5              | 23,74                     | 0,7170                                   |
| 5             | 13,73                 | 2,0              | 24,40                     | 0,5628                                   |
| 6             | 13,58                 | 1,5              | 25,74                     | 0,5276                                   |

| № добровольца      | $C_{\max}$ ,<br>мкг/мл | $T_{\max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t}$ ,<br>мкг·ч/мл | $C_{\max}/AUC_{0-t}$ ,<br>ч <sup>-1</sup> |
|--------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|---|
| 7                  | 23,42                  | 0,75              | 21,67                     | 1,0810                                    |
| 8                  | 11,63                  | 1,5               | 21,40                     | 0,5434                                    |
| 9                  | 5,22                   | 2,0               | 8,62                      | 0,6056                                    |
| 10                 | 13,45                  | 1,5               | 11,72                     | 1,1475                                    |
| 11                 | 9,86                   | 3,0               | 34,16                     | 0,2886                                    |
| 12                 | 23,66                  | 1,0               | 26,81                     | 0,8824                                    |
| 13                 | 22,82                  | 2,0               | 26,99                     | 0,8457                                    |
| 14                 | 17,91                  | 1,5               | 20,08                     | 0,8919                                    |
| 15                 | 22,86                  | 1,0               | 24,09                     | 0,9490                                    |
| 16                 | 28,22                  | 1,5               | 22,55                     | 1,2514                                    |
| 17                 | 24,68                  | 1,0               | 38,70                     | 0,6377                                    |
| 18                 | 14,31                  | 1,0               | 16,03                     | 0,8926                                    |
| 19                 | 12,20                  | 2,0               | 14,90                     | 0,8191                                    |
| 20                 | 23,35                  | 2,0               | 42,93                     | 0,5439                                    |
| 21                 | 13,02                  | 1,5               | 17,73                     | 0,7343                                    |
| 22                 | 9,06                   | 1,5               | 16,70                     | 0,5427                                    |
| 23                 | 6,37                   | 4,0               | 25,00                     | 0,2549                                    |
| 24                 | 1,77                   | 2,0               | 2,93                      | 0,6046                                    |
| 25                 | 21,37                  | 1,5               | 24,89                     | 0,8587                                    |
| 26                 | 25,58                  | 1,5               | 34,70                     | 0,7372                                    |
| 27                 | 11,49                  | 1,5               | 13,96                     | 0,8234                                    |
| 28                 | 14,11                  | 1,0               | 18,54                     | 0,7611                                    |
| 29                 | 15,13                  | 3,0               | 27,62                     | 0,5477                                    |
| 30                 | 21,85                  | 2,0               | 25,88                     | 0,8444                                    |
| 31                 | 18,84                  | 1,5               | 39,14                     | 0,4814                                    |
| 32                 | 18,12                  | 1,5               | 20,29                     | 0,8931                                    |
| 33                 | 24,77                  | 1,5               | 33,81                     | 0,7326                                    |
| 34                 | 20,64                  | 1,5               | 17,91                     | 1,1523                                    |
| 35                 | 28,61                  | 2,0               | 33,70                     | 0,8490                                    |
| 36                 | 24,69                  | 1,5               | 38,26                     | 0,6454                                    |
| 37                 | 11,02                  | 1,5               | 15,46                     | 0,7126                                    |
| 38                 | 16,6                   | 2,0               | 28,79                     | 0,5766                                    |
| 39                 | 14,93                  | 3,0               | 21,25                     | 0,7028                                    |
| 40                 | 17,26                  | 1,0               | 15,97                     | 1,0811                                    |
| 41                 | 12,21                  | 1,5               | 16,45                     | 0,7424                                    |
| 42                 | 12,33                  | 1,5               | 14,31                     | 0,8619                                    |
| 43                 | 7,78                   | 3,0               | 15,54                     | 0,5008                                    |
| 44                 | 13,13                  | 2,0               | 29,21                     | 0,4495                                    |
| 45                 | 7,96                   | 1,5               | 15,37                     | 0,5181                                    |
| 46                 | 20,65                  | 2,0               | 26,40                     | 0,7823                                    |
| 47                 | 7,11                   | 1,5               | 10,865                    | 0,6544                                    |
| 48                 | 8,52                   | 3,0               | 10,155                    | 0,8390                                    |
| <b>Ср. знач.</b>   | <b>16,66</b>           | <b>1,74</b>       | <b>22,79</b>              | <b>0,75</b>                               |
| <b>Ср. геом.</b>   | <b>14,91</b>           | <b>1,65</b>       | <b>20,82</b>              | <b>0,72</b>                               |
| <b>Медиана</b>     | <b>15,87</b>           | <b>1,50</b>       | <b>22,11</b>              | <b>0,74</b>                               |
| <b>Мин. знач.</b>  | <b>1,77</b>            | <b>0,75</b>       | <b>2,93</b>               | <b>0,25</b>                               |
| <b>Макс. знач.</b> | <b>29,31</b>           | <b>4,00</b>       | <b>42,93</b>              | <b>1,25</b>                               |

| № добровольца | $C_{\max}$ ,<br>мкг/мл | $T_{\max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t}$ ,<br>мкг·ч/мл | $C_{\max}/AUC_{0-t}$ ,<br>ч <sup>-1</sup> |
|---------------|------------------------|-------------------|---------------------------|---|
| <b>SD</b>     | <b>6,86</b>            | <b>0,64</b>       | <b>8,80</b>               | <b>0,22</b>                               |
| <b>CV</b>     | <b>41,20</b>           | <b>36,86</b>      | <b>38,61</b>              | <b>29,59</b>                              |
| <b>SE</b>     | <b>0,99</b>            | <b>0,09</b>       | <b>1,27</b>               | <b>0,03</b>                               |

Таблица 4.2

Фармакокинетические параметры микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев  
после однократного приёма препарата «Майфортик»

| № добровольца | $C_{\max}$ ,<br>мкг/мл | $T_{\max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t}$ ,<br>мкг·ч/мл | $C_{\max}/AUC_{0-t}$ ,<br>ч <sup>-1</sup> |
|---------------|------------------------|-------------------|---------------------------|---|
| 1             | 1,15                   | 18,0              | 6,90                      | 0,1667                                    |
| 2             | 18,14                  | 3,0               | 42,70                     | 0,4248                                    |
| 3             | 16,93                  | 2,0               | 26,59                     | 0,6368                                    |
| 4             | 19,68                  | 2,0               | 25,92                     | 0,7594                                    |
| 5             | 10,32                  | 3,0               | 23,19                     | 0,4450                                    |
| 6             | 14,23                  | 3,0               | 27,02                     | 0,5267                                    |
| 7             | 8,81                   | 3,0               | 16,58                     | 0,5314                                    |
| 8             | 10,17                  | 4,0               | 16,64                     | 0,6114                                    |
| 9             | 11,51                  | 3,0               | 13,19                     | 0,8726                                    |
| 10            | 6,73                   | 2,0               | 11,72                     | 0,5741                                    |
| 11            | 11,03                  | 2,0               | 25,56                     | 0,4316                                    |
| 12            | 10,51                  | 3,0               | 19,37                     | 0,5426                                    |
| 13            | 13,05                  | 2,0               | 22,88                     | 0,5704                                    |
| 14            | 17,69                  | 2,0               | 23,17                     | 0,7636                                    |
| 15            | 17,46                  | 3,0               | 28,24                     | 0,6184                                    |
| 16            | 5,85                   | 4,0               | 14,55                     | 0,4022                                    |
| 17            | 23,34                  | 2,0               | 37,44                     | 0,6235                                    |
| 18            | 7,05                   | 1,5               | 15,97                     | 0,4414                                    |
| 19            | 8,36                   | 2,0               | 11,02                     | 0,7590                                    |
| 20            | 12,23                  | 3,0               | 41,40                     | 0,2954                                    |
| 21            | 10,31                  | 3,0               | 17,86                     | 0,5772                                    |
| 22            | 9,71                   | 2,0               | 14,96                     | 0,6490                                    |
| 23            | 9,71                   | 4,0               | 25,59                     | 0,3795                                    |
| 24            | 5,05                   | 1,5               | 9,56                      | 0,5285                                    |
| 25            | 23,00                  | 1,5               | 25,66                     | 0,8962                                    |
| 26            | 18,17                  | 2,0               | 50,04                     | 0,3631                                    |
| 27            | 10,97                  | 1,5               | 13,20                     | 0,8314                                    |
| 28            | 13,63                  | 2,0               | 21,12                     | 0,6454                                    |
| 29            | 13,87                  | 4,0               | 34,90                     | 0,3975                                    |
| 30            | 7,45                   | 3,0               | 13,62                     | 0,5469                                    |
| 31            | 14,78                  | 4,0               | 42,74                     | 0,3458                                    |
| 32            | 20,82                  | 2,0               | 25,91                     | 0,8037                                    |
| 33            | 14,68                  | 2,0               | 24,38                     | 0,6021                                    |
| 34            | 5,10                   | 3,0               | 14,79                     | 0,3448                                    |
| 35            | 21,84                  | 2,0               | 36,19                     | 0,6036                                    |
| 36            | 21,07                  | 2,0               | 28,88                     | 0,7296                                    |
| 37            | 12,20                  | 2,0               | 12,28                     | 0,9939                                    |

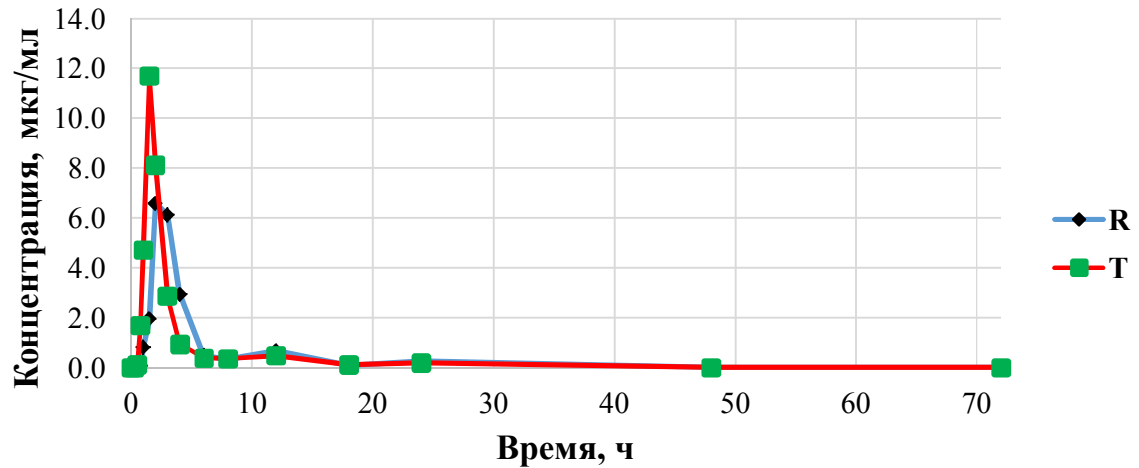
| № добровольца      | $C_{\max}$ ,<br>мкг/мл | $T_{\max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t}$ ,<br>мкг·ч/мл | $C_{\max}/AUC_{0-t}$ ,<br>ч <sup>-1</sup> |
|--------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|---|
| 38                 | 21,41                  | 1,0               | 31,64                     | 0,6766                                    |
| 39                 | 9,68                   | 3,0               | 21,55                     | 0,4493                                    |
| 40                 | 7,59                   | 3,0               | 15,83                     | 0,4795                                    |
| 41                 | 16,45                  | 3,0               | 19,93                     | 0,8254                                    |
| 42                 | 11,32                  | 3,0               | 19,62                     | 0,5771                                    |
| 43                 | 13,41                  | 3,0               | 57,32                     | 0,2340                                    |
| 44                 | 5,84                   | 4,0               | 20,43                     | 0,2859                                    |
| 45                 | 8,10                   | 2,0               | 13,22                     | 0,6127                                    |
| 46                 | 11,41                  | 3,0               | 19,16                     | 0,5955                                    |
| 47                 | 3,07                   | 3,0               | 6,94                      | 0,4424                                    |
| 48                 | 5,11                   | 4,0               | 12,11                     | 0,4221                                    |
| <b>Ср. знач.</b>   | <b>12,29</b>           | <b>2,94</b>       | <b>22,91</b>              | <b>0,56</b>                               |
| <b>Ср. геом</b>    | <b>10,82</b>           | <b>2,60</b>       | <b>20,52</b>              | <b>0,53</b>                               |
| <b>Медиана</b>     | <b>11,37</b>           | <b>3,00</b>       | <b>20,78</b>              | <b>0,57</b>                               |
| <b>Мин. знач.</b>  | <b>1,15</b>            | <b>1,00</b>       | <b>6,90</b>               | <b>0,17</b>                               |
| <b>Макс. знач.</b> | <b>23,34</b>           | <b>18,00</b>      | <b>57,32</b>              | <b>0,99</b>                               |
| <b>SD</b>          | <b>5,53</b>            | <b>2,36</b>       | <b>11,11</b>              | <b>0,18</b>                               |
| <b>CV</b>          | <b>45,02</b>           | <b>80,35</b>      | <b>48,52</b>              | <b>32,41</b>                              |
| <b>SE</b>          | <b>0,80</b>            | <b>0,34</b>       | <b>1,60</b>               | <b>0,03</b>                               |

Фармакокинетические кривые МФК (рис. 4.1) имеют мультипиковый характер, который, как было отмечено выше, связан с энтерогепатической рециркуляцией её основного метаболита - ФГМФК. Фармакокинетический профиль тестируемого препарата характеризуется более высоким уровнем максимальной концентрации МФК и более ранним временем её наступления, тогда как профиль референтного препарата демонстрирует более плавное постепенное нарастание концентрации с достижением меньших уровней  $C_{\max}$ . В связи тем, что у большинства добровольцев конечный моноэкспоненциальный участок фармакокинетической кривой содержал менее трёх точек со значениями концентрации равными или превышающими НПКО (Прил. 4, табл. 1, 2), осуществление процедуры нелинейного регрессионного анализа для вычисления константы элиминации и связанных с ней параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{1/2}$ , MRT было невозможно.

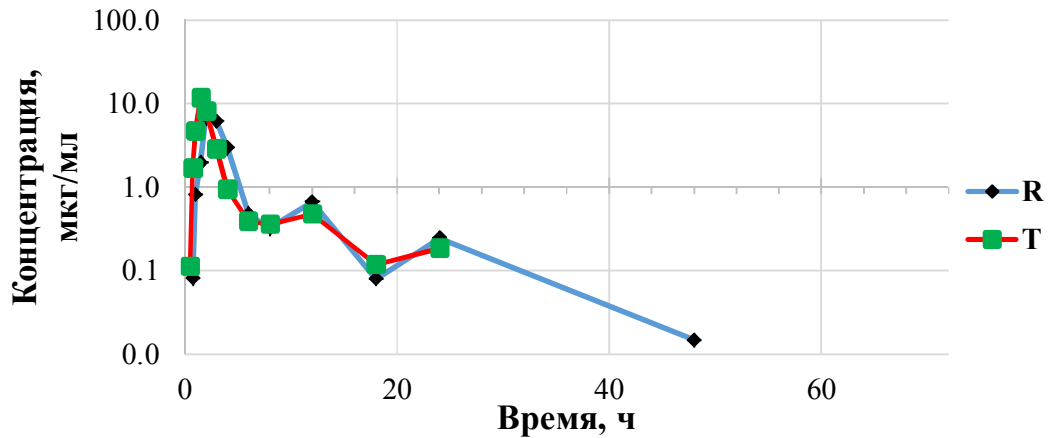
Средние значения площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время» для тестируемого препарата составили  $22,79 \pm 8,80$  мкг·ч/мл, и референтного препарата -  $22,91 \pm 11,11$  мкг·ч/мл, соответственно (табл. 4.1, 4.2). Максимальная концентрация в плазме, а также средняя скорость всасывания МФК из ЖКТ после приёма данных ЛП существенно различались. Так, среднее значение  $C_{\max}$  для тестируемого препарата составило  $16,66 \pm 6,86$  мкг/мл, для референтного препарата -  $12,29 \pm 5,53$  мкг/мл,



среднее значение  $C_{\max}/AUC_{0-t}$  для тестируемого препарата составило  $0,7518 \pm 0,2224 \text{ ч}^{-1}$ , для референтного препарата -  $0,5591 \pm 0,1812 \text{ ч}^{-1}$  (табл. 4.1, 4.2). Время достижения максимальной концентрации МФК после приёма тестируемого препарата наступает гораздо быстрее, чем после приёма референтного препарата: 1,74 ч и 2,94 ч, соответственно. Сравнение полученных значений  $T_{\max}$  с использованием Т-критерия Уилкоксона свидетельствует о наличии достоверных различий между изучаемыми препаратами ( $p=0,000$ ) (табл. 4.3).



(А)



(Б)

Рисунок 4.1. Усреднённые фармакокинетические кривые микрофеноловой кислоты после приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов в линейных (А) и полулогарифмических координатах (Б)

Таблица 4.3

Сравнение времени наступления максимальной концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма тестируемого и референтного препаратов (Т-критерий Уилкоксона)

| Медиана $T_{max}$ |      | T      | Z     | p     |
|-------------------|------|--------|-------|-------|
| T                 | R    |        |       |       |
| 1,50              | 3,00 | 45,000 | 4,906 | 0,000 |

Таблица 4.4

Индивидуальные отношения параметров, характеризующих биодоступность микофеноловой кислоты при приёме тестируемого препарата в сравнении с приёмом референтного препарата «Майфортик» («Новартис», Швейцария)

|             | $AUC_{0-t}(T) / AUC_{0-t}(R) (f')$ | $C_{max}(T) / C_{max}(R) (f'')$ | $C_{max}/AUC_{0-t}(T) / C_{max}/AUC_{0-t}(R)$ |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|---|
| Ср. знач.   | 104,66                             | 148,90                          | 141,42  |
| Ср. геом.   | 101,46                             | 137,78                          | 135,80  |
| Медиана     | 100,61                             | 129,20                          | 134,58  |
| Мин. знач.  | 27,10                              | 35,05                           | 66,88   |
| Макс. знач. | 263,15                             | 1873,91                         | 712,10  |
| SD          | 37,87                              | 262,99                          | 100,85  |
| CV          | 36,18                              | 176,62                          | 71,31   |
| SE          | 5,47                               | 37,96                           | 14,56   |

Среднее значение относительной биодоступности ( $f'$ ) микофеноловой кислоты при приеме тестируемого препарата по отношению к препарату «Майфортик» составляет  $104,66 \pm 37,87\%$ . Соотношения  $C_{max}$  изучаемых ЛП ( $f''$ ) варьируют в широком диапазоне - от 35,05 до 1873,91%. Соотношения средней скорости всасывания также характеризуются высокой вариабельностью: минимальное значение составило 66,88% максимальное значение – 712,10% (табл. 4.4).

Результаты добровольца №1 по параметру  $C_{max}$  и добровольцев № 24 и 43 по параметру  $AUC_{0-t}$  можно отнести к резко выделяющимся, т.к. значения логарифмически преобразованных отношений указанных выше параметров превосходят три стандартных отклонения (рис. 4.2, 4.3). Исходя из требований Методических указаний по проведению исследований БЭ [23] данных добровольцев можно было исключить из дальнейших расчётов. Однако, согласно новым требованиям ЕАЭС по проведению исследований БЭ [24] исключение субъектов по статистическим причинам не допускается.

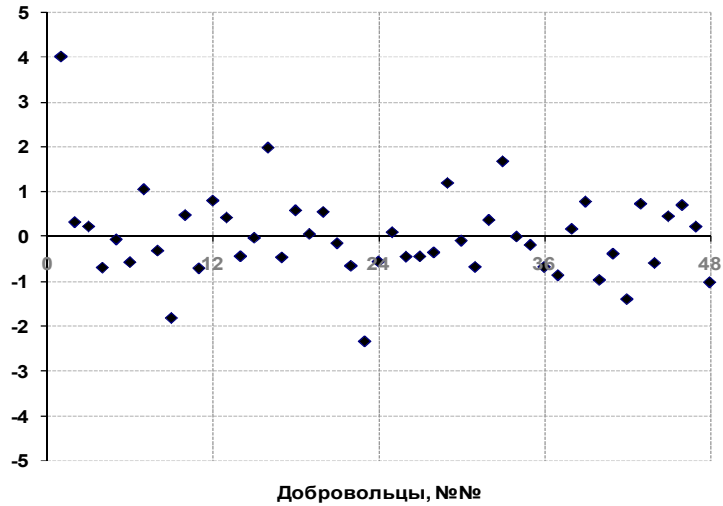


Рисунок 4.2. График стандартизованных различий для логарифмически преобразованных отношений значений  $C_{\max}$  мифеноловой кислоты (центрированных на среднее значение и нормированных на стандартное отклонение)

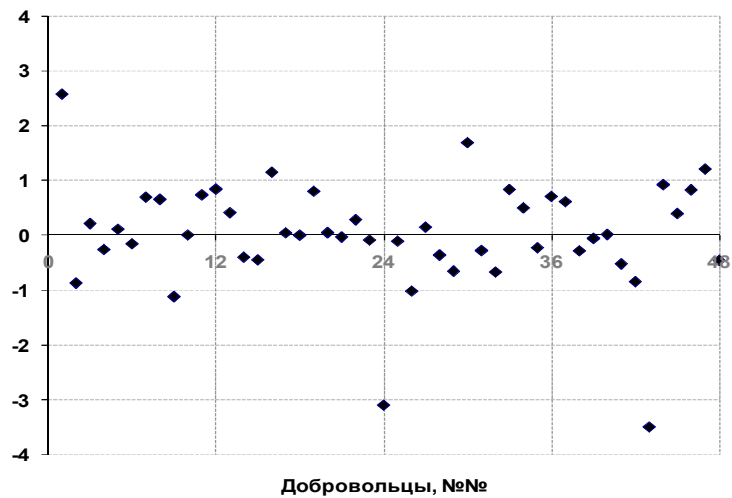


Рисунок 4.3. График стандартизованных различий для логарифмически преобразованных отношений значений  $AUC_{0-t}$  мифеноловой кислоты (центрированных на среднее значение и нормированных на стандартное отклонение)

Таблица 4.5

Результаты дисперсионного анализа значений фармакокинетических параметров микофеноловой кислоты после логарифмического преобразования данных

| Параметр                             | Источник вариации   | Число степеней свободы | Сумма квадратов отклонений | Средний квадрат отклонения | F      | P     |
|--------------------------------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|-------|
| AUC <sub>0-t</sub>                   | Препарат            | 1                      | 0,005                      | 0,005                      | 0,071  | 0,791 |
|                                      | Этап                | 1                      | 0,063                      | 0,063                      | 0,885  | 0,352 |
|                                      | Последовательность  | 1                      | 0,176                      | 0,176                      | 0,784  | 0,378 |
|                                      | Испытуемые          | 46                     | 17,828                     | 0,387                      | 5,485  | 0,000 |
|                                      | Остаточная вариация | 46                     | 3,250                      | 0,071                      | -      | -     |
|                                      | Общая вариация      | 95                     | 21,322                     | -                          | -      | -     |
| C <sub>max</sub>                     | Препарат            | 1                      | 2,465                      | 2,465                      | 12,026 | 0,001 |
|                                      | Этап                | 1                      | 0,165                      | 0,165                      | 0,803  | 0,375 |
|                                      | Последовательность  | 1                      | 0,004                      | 0,004                      | 0,013  | 0,910 |
|                                      | Испытуемые          | 46                     | 18,925                     | 0,411                      | 2,007  | 0,010 |
|                                      | Остаточная вариация | 46                     | 9,429                      | 0,205                      | -      | -     |
|                                      | Общая вариация      | 95                     | 30,988                     | -                          | -      | -     |
| C <sub>max</sub> /AUC <sub>0-t</sub> | Препарат            | 1                      | 2,248                      | 2,248                      | 21,364 | 0,000 |
|                                      | Этап                | 1                      | 0,024                      | 0,024                      | 0,230  | 0,634 |
|                                      | Последовательность  | 1                      | 0,235                      | 0,235                      | 1,676  | 0,199 |
|                                      | Испытуемые          | 46                     | 6,072                      | 0,132                      | 1,255  | 0,222 |
|                                      | Остаточная вариация | 46                     | 4,839                      | 0,105                      | -      | -     |
|                                      | Общая вариация      | 95                     | 13,418                     | -                          | -      | -     |

Результаты дисперсионного анализа (табл. 4.5) свидетельствуют о том, что основным фактором, вносящим вклад в вариабельность показателя AUC<sub>0-t</sub> являются испытуемые, в вариабельность показателя C<sub>max</sub> – изучаемые препараты и, C<sub>max</sub>/AUC<sub>0-t</sub> - изучаемые препараты. Полученные значения остаточной вариации, использовались для расчёта 90%-доверительных интервалов для отношения значений оцениваемых параметров.

Таблица 4.6

Результаты сравнения фармакокинетических параметров, характеризующих биодоступность микофеноловой кислоты

| Параметр                             | Отношение сред. | 90% доверительные интервалы |                 |                     |                 | Коэффициент внутрисубъектной вариабельности |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---|
|                                      |                 | Расчитанное значение        |                 | Приемлемое значение |                 |   |
|                                      |                 | Нижняя граница              | Верхняя граница | Нижняя граница      | Верхняя граница |   |
| AUC <sub>0-t</sub>                   | 101,46%         | 92,63%                      | 111,14%         | 80,00%              | 125,00%         | 27,06%                                      |
| C <sub>max</sub>                     | 137,78%         | 117,98%                     | 160,90%         | 77,23%              | 129,48%         | 47,70%                                      |
| C <sub>max</sub> /AUC <sub>0-t</sub> | 135,80%         | 121,52%                     | 151,77%         | 77,23%              | 129,48%         | 33,31%                                      |

Как видно из данных, приведённых в табл. 4.6, отношение средних геометрических параметра AUC<sub>0-t</sub> составило 101,46%, их 90%-ный доверительный интервал -

92,63% – 111,14%, что укладывается в допустимый диапазон границ 80,00 – 125,00%. Отношения средних геометрических значений, а также границы ДИ отношений показателей  $C_{\max}$  и  $C_{\max}/AUC_{0-t}$  выходят за установленные пределы, даже с учётом увеличения допустимого диапазона до 77,23 – 129,48% (предусмотрено протоколом исследования). Исключение данных добровольцев №1, 24 и 43 могло привести к незначительному сужению границ ДИ  $C_{\max}$  до 121,27-153,94%, границ ДИ  $C_{\max}/AUC_{0-t}$  до 117,86 - 143,54%, что не повлияло бы на результаты исследования [34]. Однако, коэффициенты внутрисубъектной вариабельности при этом значительно ниже: для параметра  $C_{\max}$  - 34,62%, для параметра  $AUC_{0-t}$  - 16,92%, для параметра  $C_{\max}/AUC_{0-t}$  - 28,35% [34]. В данном случае только величина  $CV_{\text{intra}}(C_{\max})$  соответствует уровню высоковариабельного препарата, в то время как без исключения добровольцев №1, 24 и 43 из расчётов данному критерию отвечают  $C_{\max}$  и  $C_{\max}/AUC_{0-t}$ . При этом значение  $CV_{\text{intra}}(C_{\max})$  достаточно высоко и составляет 47,70%.

В ходе повторного анализа проанализированных ранее образцов (ISR-тест) было проанализировано 96 проб (6,25% от общего их числа). При этом наблюдалась воспроизводимость аналитического метода: результаты 87,5% анализов имели расхождение в пределах  $\pm 20\%$  от первоначального значения, что удовлетворяет критерия приемлемости [22, 24, 87]. Следовательно, используемая аналитическая методика гарантирует правильность полученных данных.

В связи с этим препарат сравнения «Майфортик» в форме таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, в дозировке 360 мг (Новартис Фарма Штейн АГ, Швейцария) и тестируемый препарат не могут быть признаны биоэквивалентными [34, 36, 106].

#### **4.2. Результаты исследования биоэквивалентности метилдопы в форме таблеток с применением ВЭЖХ-МС/МС**

Отбор образцов крови производился в вакуумные пробирки, содержащие  $K_3$ ЭДТА в качестве антикоагулянта. Затем данные пробирки плавно переворачивали 4-5 раз, во избежание образования сгустка и немедленно центрифугировали в течение 5 мин при скорости 2500 об/мин и температуре  $+4^{\circ}C$ . Время от момента забора крови до начала центрифугирования составляло не более 15 мин. Далее, к полученной плазме добавлялся водный раствор стабилизатора из расчёта 0,2 мл раствора стабилизатора, содержащего

смесь аскорбиновой кислоты, натрия сульфита и натрия гидрокарбоната, на 1 мл плазмы крови. После этого образцы замораживались до температуры не выше  $-20^{\circ}\text{C}$ . Количественное определение метилдопы проводилось с помощью ВЭЖХ-МС/МС-методики (см. главу 3.2). Всего было проанализировано всего было проанализировано 864 образца.

Таблица 4.7

Фармакокинетические параметры метилдопы в плазме крови добровольцев после однократного приёма тестируемого препарата метилдопы

| № добровольца      | Последовательность | Период | $C_{\max}$ ,<br>МКГ/МЛ | $T_{\max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t}$ ,<br>МКГ·ч/МЛ | $AUC_{0-\infty}$ ,<br>МКГ·ч/МЛ | $AUC_{0-t} /$<br>$AUC_{0-\infty}$ (%) | $C_{\max} / AUC_{0-t}$ ,<br>ч <sup>-1</sup> | $K_{el}$ , ч <sup>-1</sup> | $T_{1/2}$ , ч | $MRT$ , ч    |
|--------------------|--------------------|--------|------------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------|---------------|--------------|
| 1                  | TR                 | 1      | 1,099                  | 4,00              | 5,974                     | 6,107                          | 97,81                                 | 0,1840                                      | 0,17548                    | 3,95          | 5,00         |
| 2                  | RT                 | 2      | 2,062                  | 2,50              | 11,692                    | 11,942                         | 97,90                                 | 0,1764                                      | 0,11198                    | 6,19          | 5,25         |
| 3                  | TR                 | 1      | 0,550                  | 6,00              | 4,038                     | 4,155                          | 97,18                                 | 0,1362                                      | 0,19312                    | 3,59          | 6,04         |
| 4                  | RT                 | 2      | 0,832                  | 1,25              | 3,978                     | 4,042                          | 98,42                                 | 0,2092                                      | 0,23759                    | 2,92          | 4,66         |
| 5                  | TR                 | 1      | 0,709                  | 2,00              | 3,272                     | 3,346                          | 97,81                                 | 0,2167                                      | 0,37385                    | 1,85          | 4,24         |
| 6                  | RT                 | 2      | 2,416                  | 4,00              | 12,378                    | 12,576                         | 98,43                                 | 0,1952                                      | 0,15009                    | 4,62          | 5,91         |
| 7                  | RT                 | 2      | 0,820                  | 2,50              | 3,456                     | 3,546                          | 97,46                                 | 0,2373                                      | 0,34315                    | 2,02          | 4,20         |
| 8                  | RT                 | 2      | 0,821                  | 1,50              | 3,014                     | 3,163                          | 95,29                                 | 0,2724                                      | 0,22063                    | 3,14          | 3,89         |
| 9                  | TR                 | 1      | 2,185                  | 3,00              | 10,555                    | 10,796                         | 97,77                                 | 0,2070                                      | 0,11552                    | 6,00          | 5,74         |
| 10                 | RT                 | 2      | 1,373                  | 3,00              | 6,775                     | 6,990                          | 96,92                                 | 0,2027                                      | 0,09155                    | 7,57          | 5,60         |
| 11                 | TR                 | 1      | 0,706                  | 6,00              | 4,345                     | -                              | -                                     | 0,1625                                      | -                          | -             | -            |
| 12                 | RT                 | 2      | 0,713                  | 4,00              | 3,665                     | 3,761                          | 97,46                                 | 0,1945                                      | 0,40112                    | 1,73          | 4,87         |
| 13                 | TR                 | 1      | 1,403                  | 4,00              | 8,076                     | 8,177                          | 98,76                                 | 0,1737                                      | 0,15268                    | 4,54          | 5,33         |
| 14                 | RT                 | 2      | 1,178                  | 4,00              | 7,887                     | 7,957                          | 99,12                                 | 0,1494                                      | 0,20485                    | 3,38          | 5,84         |
| 15                 | TR                 | 1      | 1,277                  | 2,50              | 4,861                     | 4,909                          | 99,02                                 | 0,2627                                      | 0,27312                    | 2,54          | 4,41         |
| 16                 | TR                 | 1      | 1,410                  | 3,00              | 5,760                     | 5,871                          | 98,11                                 | 0,2448                                      | 0,18405                    | 3,77          | 4,60         |
| 17                 | RT                 | 2      | 0,713                  | 3,00              | 3,972                     | 4,039                          | 98,35                                 | 0,1795                                      | 0,25244                    | 2,75          | 5,52         |
| 18                 | TR                 | 1      | 1,425                  | 4,00              | 10,247                    | 10,418                         | 98,35                                 | 0,1391                                      | 0,14400                    | 4,81          | 6,38         |
| 19                 | TR                 | 1      | 0,693                  | 2,25              | 4,024                     | 4,123                          | 97,60                                 | 0,1722                                      | 0,35946                    | 1,93          | 4,22         |
| 20                 | RT                 | 2      | 2,617                  | 3,00              | 11,116                    | 11,373                         | 97,74                                 | 0,2354                                      | 0,09572                    | 7,24          | 5,11         |
| 21                 | RT                 | 2      | 0,672                  | 2,25              | 3,336                     | 3,410                          | 97,83                                 | 0,2014                                      | 0,35595                    | 1,95          | 4,08         |
| 22                 | TR                 | 1      | 1,849                  | 3,00              | 8,801                     | 9,143                          | 96,26                                 | 0,2101                                      | 0,07375                    | 9,40          | 5,50         |
| 23                 | RT                 | 2      | 0,794                  | 1,50              | 3,099                     | 3,175                          | 97,62                                 | 0,2562                                      | 0,33363                    | 2,08          | 3,57         |
| 24                 | TR                 | 1      | 1,121                  | 4,00              | 4,934                     | 5,009                          | 98,51                                 | 0,2272                                      | 0,43325                    | 1,60          | 4,43         |
| <b>Ср. знач.</b>   |                    |        | <b>1,227</b>           | <b>3,18</b>       | <b>6,219</b>              | <b>6,436</b>                   | <b>97,81</b>                          | <b>0,2019</b>                               | <b>0,22943</b>             | <b>3,89</b>   | <b>4,97</b>  |
| <b>Ср. геом.</b>   |                    |        | <b>1,105</b>           | <b>2,95</b>       | <b>5,567</b>              | <b>5,754</b>                   | <b>97,81</b>                          | <b>0,1985</b>                               | <b>0,20323</b>             | <b>3,41</b>   | <b>4,92</b>  |
| <b>Медиана</b>     |                    |        | <b>1,110</b>           | <b>3,00</b>       | <b>4,898</b>              | <b>5,009</b>                   | <b>97,81</b>                          | <b>0,2021</b>                               | <b>0,20485</b>             | <b>3,38</b>   | <b>5,00</b>  |
| <b>Мин. знач.</b>  |                    |        | <b>0,550</b>           | <b>1,25</b>       | <b>3,014</b>              | <b>3,163</b>                   | <b>95,29</b>                          | <b>0,1362</b>                               | <b>0,07375</b>             | <b>1,60</b>   | <b>3,57</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> |                    |        | <b>2,617</b>           | <b>6,00</b>       | <b>12,378</b>             | <b>12,576</b>                  | <b>99,12</b>                          | <b>0,2724</b>                               | <b>0,43325</b>             | <b>9,40</b>   | <b>6,38</b>  |
| <b>SD</b>          |                    |        | <b>0,601</b>           | <b>1,23</b>       | <b>3,080</b>              | <b>3,181</b>                   | <b>0,86</b>                           | <b>0,0377</b>                               | <b>0,10984</b>             | <b>2,13</b>   | <b>0,77</b>  |
| <b>CV</b>          |                    |        | <b>48,97</b>           | <b>38,65</b>      | <b>49,53</b>              | <b>49,43</b>                   | <b>0,88</b>                           | <b>18,66</b>                                | <b>47,88</b>               | <b>54,78</b>  | <b>15,47</b> |
| <b>SE</b>          |                    |        | <b>0,123</b>           | <b>0,25</b>       | <b>0,629</b>              | <b>0,663</b>                   | <b>0,18</b>                           | <b>0,0077</b>                               | <b>0,02290</b>             | <b>0,44</b>   | <b>0,16</b>  |

Фармакокинетические параметры метилдопы в плазме крови добровольцев после однократного приёма референтного препарата «Допегит» (ОАО «ЭГИС», Венгрия)

| № добровольца      | Последовательность | Период | $C_{max}$<br>МКГ/МЛ | $T_{max}$<br>ч | $AUC_{0-t}$<br>МКГ·ч/МЛ | $AUC_{0-\infty}$<br>МКГ·ч/МЛ | $AUC_{0-t}/$<br>$AUC_{0-\infty}$ (%) | $C_{max}/AUC_{0-t}$<br>ч <sup>-1</sup> | $K_{el}$ , ч <sup>-1</sup> | $T_{1/2}$ , ч | MRT, ч       |
|--------------------|--------------------|--------|---------------------|----------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|----------------------------|---------------|--------------|
| 1                  | TR                 | 2      | 1,411               | 4,00           | 8,461                   | 8,642                        | 97,91                                | 0,1668                                 | 0,10198                    | 6,80          | 5,44         |
| 2                  | RT                 | 1      | 2,275               | 2,50           | 9,49                    | 9,775                        | 97,09                                | 0,2397                                 | 0,09155                    | 7,57          | 5,43         |
| 3                  | TR                 | 2      | 1,072               | 1,50           | 4,008                   | 4,11                         | 97,51                                | 0,2675                                 | 0,33456                    | 2,07          | 3,89         |
| 4                  | RT                 | 1      | 0,854               | 4,00           | 5,035                   | 5,164                        | 97,50                                | 0,1696                                 | 0,17404                    | 3,98          | 5,09         |
| 5                  | TR                 | 2      | 0,594               | 1,50           | 2,901                   | 2,98                         | 97,36                                | 0,2047                                 | 0,33301                    | 2,08          | 4,05         |
| 6                  | RT                 | 1      | 1,394               | 2,25           | 8,432                   | 8,511                        | 99,07                                | 0,1653                                 | 0,20134                    | 3,44          | 5,21         |
| 7                  | RT                 | 1      | 0,745               | 3,00           | 3,827                   | 4,009                        | 95,46                                | 0,1947                                 | 0,11354                    | 6,10          | 5,11         |
| 8                  | RT                 | 1      | 1,638               | 3,00           | 7,913                   | 8,059                        | 98,19                                | 0,2070                                 | 0,12295                    | 5,64          | 5,04         |
| 9                  | TR                 | 2      | 1,836               | 3,00           | 8,383                   | 8,612                        | 97,34                                | 0,2190                                 | 0,10531                    | 6,58          | 5,68         |
| 10                 | RT                 | 1      | 1,504               | 2,25           | 7,108                   | 7,358                        | 96,61                                | 0,2116                                 | 0,08657                    | 8,01          | 5,73         |
| 11                 | TR                 | 2      | 1,394               | 3,00           | 8,569                   | 8,633                        | 99,26                                | 0,1627                                 | 0,29993                    | 2,31          | 5,24         |
| 12                 | RT                 | 1      | 1,786               | 3,00           | 8,119                   | 8,242                        | 98,51                                | 0,2200                                 | 0,19302                    | 3,59          | 4,64         |
| 13                 | TR                 | 2      | 1,547               | 3,00           | 7,615                   | 7,847                        | 97,05                                | 0,2031                                 | 0,09155                    | 7,57          | 5,52         |
| 14                 | RT                 | 1      | 0,963               | 4,00           | 5,22                    | 5,315                        | 98,21                                | 0,1845                                 | 0,19360                    | 3,58          | 4,89         |
| 15                 | TR                 | 2      | 0,57                | 1,75           | 2,545                   | 2,61                         | 97,50                                | 0,2240                                 | 0,33459                    | 2,07          | 4,03         |
| 16                 | TR                 | 2      | 0,967               | 4,00           | 5,011                   | 5,141                        | 97,47                                | 0,1930                                 | 0,16519                    | 4,20          | 4,95         |
| 17                 | RT                 | 1      | 0,798               | 4,00           | 6,579                   | 6,651                        | 98,92                                | 0,1213                                 | 0,20245                    | 3,42          | 6,31         |
| 18                 | TR                 | 2      | 1,389               | 2,25           | 9,702                   | 9,776                        | 99,24                                | 0,1432                                 | 0,21122                    | 3,28          | 5,70         |
| 19                 | TR                 | 2      | 1,013               | 4,00           | 5,433                   | 5,575                        | 97,45                                | 0,1865                                 | 0,36151                    | 1,92          | 4,41         |
| 20                 | RT                 | 1      | 1,408               | 3,00           | 7,535                   | 7,804                        | 96,55                                | 0,1869                                 | 0,07556                    | 9,17          | 5,56         |
| 21                 | RT                 | 1      | 1,043               | 2,50           | 4,508                   | 4,58                         | 98,42                                | 0,2314                                 | 0,39650                    | 1,75          | 3,89         |
| 22                 | TR                 | 2      | 1,224               | 4,00           | 8,113                   | 8,391                        | 96,68                                | 0,1509                                 | 0,09257                    | 7,49          | 6,18         |
| 23                 | RT                 | 1      | 1,304               | 1,75           | 4,726                   | 4,835                        | 97,75                                | 0,2759                                 | 0,31197                    | 2,22          | 3,56         |
| 24                 | TR                 | 2      | 0,873               | 2,25           | 4,002                   | 4,087                        | 97,92                                | 0,2181                                 | 0,36166                    | 1,92          | 4,06         |
| <b>Ср. знач.</b>   |                    |        | <b>1,233</b>        | <b>2,90</b>    | <b>6,385</b>            | <b>6,529</b>                 | <b>97,71</b>                         | <b>0,1978</b>                          | <b>0,20651</b>             | <b>4,45</b>   | <b>4,98</b>  |
| <b>Ср. геом.</b>   |                    |        | <b>1,164</b>        | <b>2,76</b>    | <b>5,990</b>            | <b>6,131</b>                 | <b>97,70</b>                         | <b>0,1944</b>                          | <b>0,17962</b>             | <b>3,86</b>   | <b>4,93</b>  |
| <b>Медиана</b>     |                    |        | <b>1,264</b>        | <b>3,00</b>    | <b>6,844</b>            | <b>7,005</b>                 | <b>97,51</b>                         | <b>0,1989</b>                          | <b>0,19331</b>             | <b>3,59</b>   | <b>5,10</b>  |
| <b>Мин. знач.</b>  |                    |        | <b>0,570</b>        | <b>1,50</b>    | <b>2,545</b>            | <b>2,610</b>                 | <b>95,46</b>                         | <b>0,1213</b>                          | <b>0,07556</b>             | <b>1,75</b>   | <b>3,56</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> |                    |        | <b>2,275</b>        | <b>4,00</b>    | <b>9,702</b>            | <b>9,776</b>                 | <b>99,26</b>                         | <b>0,2759</b>                          | <b>0,39650</b>             | <b>9,17</b>   | <b>6,31</b>  |
| <b>SD</b>          |                    |        | <b>0,419</b>        | <b>0,86</b>    | <b>2,153</b>            | <b>2,187</b>                 | <b>0,93</b>                          | <b>0,0372</b>                          | <b>0,10709</b>             | <b>2,37</b>   | <b>0,76</b>  |
| <b>CV</b>          |                    |        | <b>33,97</b>        | <b>29,79</b>   | <b>33,72</b>            | <b>33,49</b>                 | <b>0,95</b>                          | <b>18,79</b>                           | <b>51,86</b>               | <b>53,37</b>  | <b>15,34</b> |
| <b>SE</b>          |                    |        | <b>0,086</b>        | <b>0,18</b>    | <b>0,440</b>            | <b>0,446</b>                 | <b>0,19</b>                          | <b>0,0076</b>                          | <b>0,02186</b>             | <b>0,48</b>   | <b>0,16</b>  |

Индивидуальные концентрации метилдопы в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого и референтного препаратов метилдопы представлены в таблицах 1, 2 (Прил. 5), усреднённые фармакокинетические кривые - на рис. 4.4. Среднее значение соотношения параметров  $AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}$  для тестируемого препарата составило

97,81%, а для референтного препарата – 97,71%, что указывает на достаточную длительность наблюдения (табл. 4.7, 4.8). Параметры  $AUC_{0-\infty}$ ,  $K_{el}$ ,  $T_{1/2}$  и  $MRT$  у добровольца № 11 после приёма тестируемого препарата не оценивались из-за недостаточного количества точек с ненулевыми значениями концентраций в фазе элиминации.

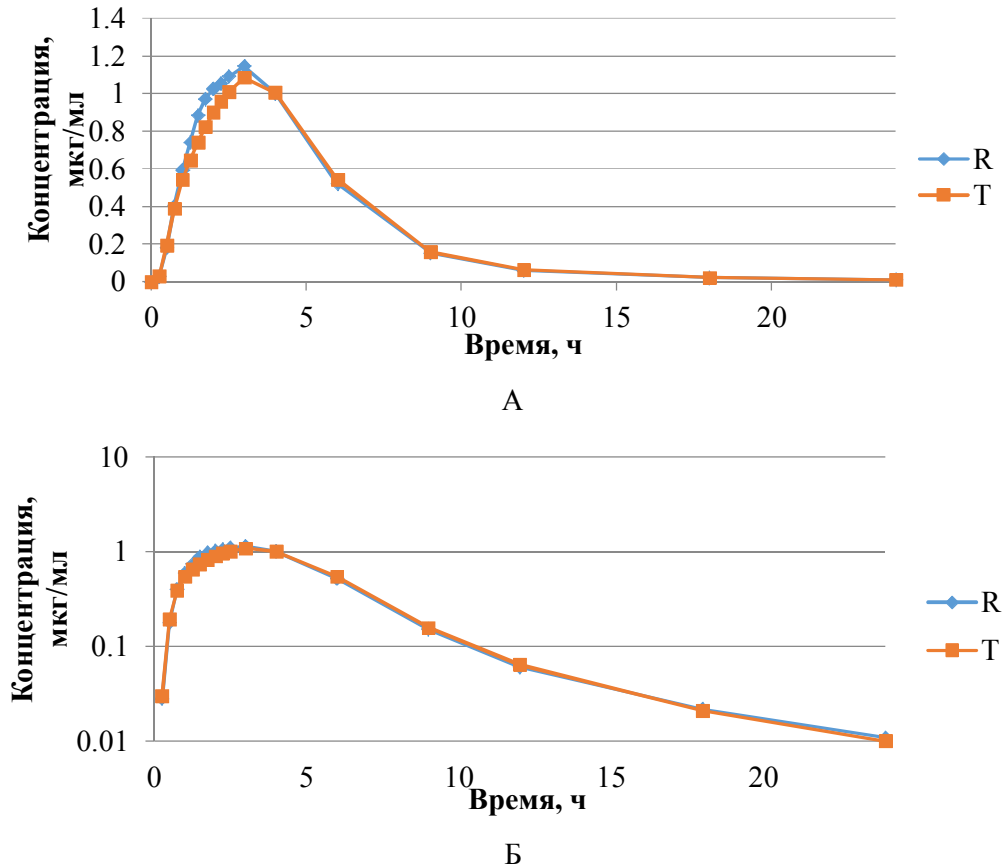


Рисунок 4.4. Усреднённые фармакокинетические кривые после приёма тестируемого и референтного препаратов метилдопы в линейных (А) и полулогарифмических (Б) координатах

Средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы, площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время» ( $AUC_{0-t}$ ) – для тестируемого препарата составили  $6,219 \pm 3,080$  мкг·ч/мл, и референтного препарата -  $6,385 \pm 2,153$  мкг·ч/мл, соответственно. Значения максимальных концентраций метилдопы ( $C_{max}$ ) при приёме тестируемого препарата варьировали в диапазоне от 0,550 до 2,617 мкг/мл (сред. знач.  $\pm$ SD -  $1,227 \pm 0,601$  мкг/мл), при приёме препарата сравнения – в диапазоне от 0,570 до 2,275 мкг/мл (сред. знач.  $\pm$ SD -  $1,233 \pm 0,419$  мкг/мл). Средняя скорость всасывания ( $C_{max}/AUC_{0-t}$ ) тестируемого препарата из желудочно-кишечного тракта составила  $0,2019 \pm 0,0377$  ч<sup>-1</sup>, рефе-



рентного препарата -  $0,1978 \pm 0,0372 \text{ ч}^{-1}$  (табл. 4.9, 4.10). Для тестируемого и референтного препаратов получены близкие показатели периода полувыведения -  $3,89 \pm 2,13 \text{ ч}$  (Т) и  $4,45 \pm 2,37 \text{ ч}$  (R), константы элиминации -  $0,2294 \pm 0,1098 \text{ ч}^{-1}$  (Т) и  $0,2065 \pm 0,1071 \text{ ч}^{-1}$  (R), и среднего времени пребывания препарата в организме -  $4,97 \pm 0,77 \text{ ч}$  (Т) и  $4,98 \pm 0,76 \text{ ч}$  (R). Медианы времени достижения максимальной концентрации для обоих препаратов совпадают. Сравнение полученных в ходе исследования значений  $T_{\max}$  с использованием Т-критерия Уилкоксона также не выявило достоверных различий между изучаемыми препаратами ( $p=0,467$ ) (табл. 4.9).

Таблица 4.9

Сравнение времени наступления максимальной концентрации метилдопы в плазме крови добровольцев после однократного приёма тестируемого и референтного препаратов (Т-критерий Уилкоксона)

| Медиана |      | Т     | Z     | p     |
|---------|------|-------|-------|-------|
| Т       | Р    |       |       |       |
| 3,00    | 3,00 | 77,00 | 0,724 | 0,469 |

Таблица 4.10

Индивидуальные отношения параметров, характеризующих биодоступность при приёме тестируемого препарата метилдопы в сравнении с приёмом референтного препарата «Допегит» (ОАО «ЭГИС», Венгрия)

|             | $AUC_{0-t} (T) / AUC_{0-t} (R) (f')$ | $C_{\max} (T) / C_{\max} (R) (f'')$ | $C_{\max} / AUC_{0-t} (T) / C_{\max} / AUC_{0-t} (R)$ |
|-------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Ср. знач.   | 100,03                               | 104,37                              | 104,65  |
| Ср. геом.   | 92,93                                | 94,89                               | 102,11  |
| Медиана     | 103,19                               | 94,36                               | 102,01  |
| Мин. знач.  | 38,09                                | 39,92                               | 50,92   |
| Макс. знач. | 191,02                               | 224,04                              | 147,99  |
| SD          | 37,54                                | 46,67                               | 22,53   |
| CV          | 37,53                                | 44,71                               | 21,53   |
| SE          | 7,66                                 | 9,53                                | 4,60  |

Значения относительной биодоступности ( $f'$ ) метилдопы при приеме тестируемого препарата по отношению к препарату «Допегит» варьируют в широком диапазоне от 38,09 до 191,02%. Однако, среднее значение данного показателя составляет  $100,03 \pm 37,54\%$ . Соотношения  $C_{\max}$  изучаемых ЛП ( $f''$ ) также находятся в широких пределах от 39,92 до 224,04%, а среднее значение данного соотношения близко к 100% -  $104,37 \pm 46,67\%$ . Соотношения средней скорости всасывания характеризуются меньшей

вариабельностью: минимальное значение составило 50,92%, максимальное значение - 147,99%, среднее значение -  $104,65 \pm 22,53\%$  (табл. 4.10).

Многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) логарифмически преобразованных значений соотношений  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $C_{max}/AUC_{0-t}$  выполнялся для установления вклада таких факторов, как субъекты исследования, препарат, этап и последовательность приёма в наблюдаемую вариабельность данных.

Таблица 4.11

Результаты дисперсионного анализа значений фармакокинетических параметров метилдопы после логарифмического преобразования данных

| Параметр            | Источник вариации   | Сумма квадратов отклонений | Число степеней свободы | Средний квадрат отклонения | F     | P     |
|---------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|-------|-------|
| $AUC_{0-t}$         | Препарат            | 0,064                      | 1,000                  | 0,064                      | 0,794 | 0,383 |
|                     | Этап                | 0,101                      | 1,000                  | 0,101                      | 1,243 | 0,277 |
|                     | Последовательность  | 0,001                      | 1,000                  | 0,001                      | 0,003 | 0,961 |
|                     | Испытуемые          | 6,614                      | 22,000                 | 0,301                      | 3,702 | 0,002 |
|                     | Остаточная вариация | 1,786                      | 22,000                 | 0,081                      | -     | -     |
|                     | Общая вариация      | 8,567                      | 47,000                 | -                          | -     | -     |
| $C_{max}$           | Препарат            | 0,033                      | 1,000                  | 0,033                      | 0,317 | 0,579 |
|                     | Этап                | 0,050                      | 1,000                  | 0,050                      | 0,484 | 0,494 |
|                     | Последовательность  | 0,042                      | 1,000                  | 0,042                      | 0,174 | 0,680 |
|                     | Испытуемые          | 5,328                      | 22,000                 | 0,242                      | 2,330 | 0,027 |
|                     | Остаточная вариация | 2,287                      | 22,000                 | 0,104                      | -     | -     |
|                     | Общая вариация      | 7,740                      | 47,000                 | -                          | -     | -     |
| $C_{max}/AUC_{0-t}$ | Препарат            | 0,005                      | 1,000                  | 0,005                      | 0,185 | 0,671 |
|                     | Этап                | 0,009                      | 1,000                  | 0,009                      | 0,310 | 0,584 |
|                     | Последовательность  | 0,032                      | 1,000                  | 0,032                      | 0,669 | 0,422 |
|                     | Испытуемые          | 1,043                      | 22,000                 | 0,047                      | 1,680 | 0,116 |
|                     | Остаточная вариация | 0,621                      | 22,000                 | 0,028                      | -     | -     |
|                     | Общая вариация      | 1,710                      | 47,000                 | -                          | -     | -     |

Результаты дисперсионного анализа (табл. 4.11) свидетельствуют о том, что основным фактором, вносящим вклад в вариабельность показателей  $AUC_{0-t}$  и  $C_{max}$  являются испытуемые ( $p=0,002$ ,  $p=0,027$ , соответственно). Влияние перечисленных выше факторов на вариабельность параметра  $C_{max}/AUC_{0-t}$  является незначительным. Полученные значения остаточной вариации (для  $AUC_{0-t}$  – 0,081, для  $C_{max}$  – 0,104, для  $C_{max}/AUC_{0-t}$  – 0,028), использовались для расчёта 90%-доверительных интервалов для отношения значений оцениваемых параметров.

Результаты сравнения фармакокинетических параметров, характеризующих биодоступность метилдопы

| Параметр            | Отношение<br>Сред. геом. | 90% доверительные интервалы |                    |                     |                    | Коэффициент<br>внутрисубъектной<br>вариабельности |
|---------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---|
|                     |                          | Рассчитанное значение       |                    | Приемлемое значение |                    |   |
|                     |                          | Нижняя<br>граница           | Верхняя<br>граница | Нижняя<br>граница   | Верхняя<br>граница |   |
| $AUC_{0-t}$         | 92,93%                   | 80,69%                      | 107,03%            | 80,00%              | 125,00%            | 29,08%  |
| $C_{max}$           | 94,89%                   | 80,88%                      | 111,34%            | 80,00%              | 125,00%            | 33,10%  |
| $C_{max}/AUC_{0-t}$ | 102,11%                  | 93,95%                      | 110,98%            | 80,00%              | 125,00%            | 16,92%  |

Полученные значения отношений геометрического среднего и 90%-доверительные интервалы отношений параметров  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $C_{max}/AUC_{0-t}$  укладываются в допустимые пределы – от 80,00% до 125,00% (табл. 4.12). В ходе ISR-теста было проанализировано 96 проб (11,11% от общего их числа). Результаты измерений всех образцов имели расхождение в пределах  $\pm 20\%$  от первоначального значения, что полностью удовлетворяет критерия приемлемости [22, 24, 85]. Следовательно, используемая аналитическая методика и выбранный способ стабилизации анализа гарантирует правильность полученных данных и сохранность образцов, полученных от добровольцев. Таким образом, тестируемый препарат метилдопы и «Допегит» («ЭГИС», Венгрия) являются биоэквивалентными [41, 108, 109].

#### 4.3. Результаты исследования фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением с применением ВЭЖХ-МС/МС

При исследовании фармакокинетики препарата «Дюспаталин» в качестве антикоагулянта был использован  $K_3$ ЭДТА. Плазму, полученную после центрифугирования образцов крови при 2500 об/мин в течение 10 мин, замораживали и хранили при температуре не выше - 20 °С. Измерение концентрации МК и ДМК было выполнено с помощью ВЭЖХ-МС/МС метода (см. главу 3.3). Всего было проанализировано 360 образцов.

Фармакокинетические параметры **мебевериновой кислоты** в плазме крови добровольцев после однократного приёма препарата «Дюспаталин»

| № добровольца      | $C_{max}$ ,<br>нг/мл | $T_{max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-4}$ ,<br>нг·ч/мл | $AUC_{0-\infty}$ ,<br>нг·ч/мл | $AUC_{0-t} /$<br>$AUC_{0-\infty}$<br>(%) | $C_{max} /$<br>$AUC_{0-4}$<br>ч <sup>-1</sup> | $K_{el}$ , ч <sup>-1</sup> | $T_{1/2}$ , ч | MRT, ч       |
|--------------------|----------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|--|---|----------------------------|---------------|--------------|
| 1                  | 38,20                | 4,00             | 181,20                   | 223,72                        | 80,99                                    | 0,2108  | 0,28784                    | 2,41          | 5,55         |
| 2                  | 91,90                | 5,00             | 498,25                   | 535,48                        | 93,05                                    | 0,1844  | 0,35986                    | 1,93          | 5,02         |
| 3                  | 58,90                | 2,00             | 290,85                   | 373,38                        | 77,90                                    | 0,2025  | 0,23666                    | 2,93          | 5,75         |
| 4                  | 36,00                | 2,50             | 200,45                   | 337,51                        | 59,39                                    | 0,1796  | 0,08683                    | 7,98          | 11,45        |
| 5                  | 58,70                | 3,00             | 339,30                   | 411,27                        | 82,50                                    | 0,1730  | 0,20588                    | 3,37          | 6,37         |
| 6                  | 46,60                | 5,00             | 235,10                   | 277,67                        | 84,67                                    | 0,1982  | 0,24787                    | 2,80          | 6,29         |
| 7                  | 53,10                | 2,50             | 322,08                   | 364,93                        | 88,26                                    | 0,1649  | 0,20080                    | 3,45          | 6,14         |
| 8                  | 173,50               | 3,50             | 581,73                   | 605,72                        | 96,04                                    | 0,2983  | 0,43138                    | 1,61          | 4,69         |
| 9                  | 55,80                | 3,50             | 260,23                   | 323,81                        | 80,36                                    | 0,2144  | 0,27953                    | 2,48          | 5,62         |
| 10                 | 22,30                | 3,00             | 54,03                    | -                             | -  | 0,4128  | -                          | -             | -            |
| 11                 | 123,00               | 3,50             | 601,03                   | 649,49                        | 92,54                                    | 0,2047  | 0,33065                    | 2,10          | 4,99         |
| 12                 | 39,40                | 3,50             | 150,20                   | 186,67                        | 80,46                                    | 0,2623  | 0,41375                    | 1,68          | 4,27         |
| 13                 | 59,00                | 3,50             | 291,00                   | 349,83                        | 83,18                                    | 0,2027  | 0,19513                    | 3,55          | 6,14         |
| 14                 | 66,70                | 3,50             | 330,45                   | 365,21                        | 90,48                                    | 0,2018  | 0,29548                    | 2,35          | 5,26         |
| 15                 | 42,90                | 1,50             | 227,25                   | 282,51                        | 80,44                                    | 0,1888  | 0,20445                    | 3,39          | 6,76         |
| 16                 | 83,20                | 5,00             | 448,28                   | 503,59                        | 89,02                                    | 0,1856  | 0,31544                    | 2,20          | 5,95         |
| 17                 | 32,40                | 3,50             | 150,13                   | 316,54                        | 47,43                                    | 0,2158  | 0,13766                    | 5,04          | 8,53         |
| 18                 | 56,90                | 2,00             | 246,63                   | 304,52                        | 80,99                                    | 0,2307  | 0,22962                    | 3,02          | 5,18         |
| 19                 | 37,80                | 2,50             | 181,75                   | 215,53                        | 84,33                                    | 0,2080  | 0,30223                    | 2,29          | 4,98         |
| 20                 | 59,90                | 2,00             | 249,35                   | 286,37                        | 87,07                                    | 0,2402  | 0,30489                    | 2,27          | 4,50         |
| 21                 | 115,60               | 3,50             | 550,88                   | 593,75                        | 92,78                                    | 0,2098  | 0,33158                    | 2,09          | 4,92         |
| 22                 | 27,50                | 2,00             | 73,33                    | 110,01                        | 66,65                                    | 0,3750  | 0,31897                    | 2,17          | 4,69         |
| 23                 | 83,40                | 3,50             | 400,58                   | 431,18                        | 92,90                                    | 0,2082  | 0,35189                    | 1,97          | 5,09         |
| 24                 | 37,80                | 5,00             | 190,53                   | -                             | -  | 0,1984  | -                          | -             | -            |
| <b>Ср. знач.</b>   | <b>62,52</b>         | <b>3,27</b>      | <b>293,94</b>            | <b>365,85</b>                 | <b>82,34</b>                             | <b>0,2238</b>                                 | <b>0,27584</b>             | <b>2,87</b>   | <b>5,82</b>  |
| <b>Ср. геом.</b>   | <b>55,29</b>         | <b>3,11</b>      | <b>253,71</b>            | <b>338,80</b>                 | <b>81,39</b>                             | <b>0,2179</b>                                 | <b>0,26087</b>             | <b>2,66</b>   | <b>5,67</b>  |
| <b>Медиана</b>     | <b>56,35</b>         | <b>3,50</b>      | <b>254,79</b>            | <b>343,67</b>                 | <b>83,75</b>                             | <b>0,2063</b>                                 | <b>0,29166</b>             | <b>2,38</b>   | <b>5,40</b>  |
| <b>Мин. знач.</b>  | <b>22,30</b>         | <b>1,50</b>      | <b>54,03</b>             | <b>110,01</b>                 | <b>47,43</b>                             | <b>0,1649</b>                                 | <b>0,08683</b>             | <b>1,61</b>   | <b>4,27</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> | <b>173,50</b>        | <b>5,00</b>      | <b>601,03</b>            | <b>649,49</b>                 | <b>96,04</b>                             | <b>0,4128</b>                                 | <b>0,43138</b>             | <b>7,98</b>   | <b>11,45</b> |
| <b>SD</b>          | <b>35,01</b>         | <b>1,03</b>      | <b>151,78</b>            | <b>140,49</b>                 | <b>11,61</b>                             | <b>0,0598</b>                                 | <b>0,08426</b>             | <b>1,39</b>   | <b>1,57</b>  |
| <b>CV</b>          | <b>56,00</b>         | <b>31,55</b>     | <b>51,64</b>             | <b>38,40</b>                  | <b>14,10</b>                             | <b>26,72</b>                                  | <b>30,55</b>               | <b>48,38</b>  | <b>26,91</b> |
| <b>SE</b>          | <b>7,15</b>          | <b>0,21</b>      | <b>30,98</b>             | <b>29,95</b>                  | <b>2,48</b>                              | <b>0,0122</b>                                 | <b>0,01796</b>             | <b>0,30</b>   | <b>0,33</b>  |

Фармакокинетические параметры деметилированной мебевериновой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма препарата «Дюспаталин»

| № добровольца      | $C_{\max}$ ,<br>нг/мл | $T_{\max}$ ,<br>ч | $AUC_{0-t_6}$<br>нг·ч/мл | $AUC_{0-\infty}$<br>нг·ч/мл | $AUC_{0-t} /$<br>$AUC_{0-\infty}$<br>(%) | $C_{\max} /$<br>$AUC_{0-t_6}$<br>ч <sup>-1</sup> | $K_{el}$ , ч <sup>-1</sup> | $T_{1/2}$ , ч | MRT, ч       |
|--------------------|-----------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|--|--|----------------------------|---------------|--------------|
| 1                  | 195,60                | 2,50              | 1965,63                  | 2637,79                     | 74,52                                    | 0,0995   | 0,05191                    | 13,35         | 17,55        |
| 2                  | 366,60                | 5,00              | 3262,43                  | 3547,35                     | 91,97                                    | 0,1124   | 0,10795                    | 6,42          | 9,81         |
| 3                  | 197,50                | 2,00              | 2016,28                  | 2370,62                     | 85,05                                    | 0,0980   | 0,08184                    | 8,47          | 12,85        |
| 4                  | 160,40                | 2,50              | 1305,50                  | 3236,23                     | 40,34                                    | 0,1229   | 0,04631                    | 14,97         | 22,49        |
| 5                  | 200,30                | 8,00              | 2355,98                  | 2540,33                     | 92,74                                    | 0,0850   | 0,11772                    | 5,89          | 10,06        |
| 6                  | 191,90                | 5,00              | 2289,45                  | 2792,84                     | 81,98                                    | 0,0838   | 0,07690                    | 9,01          | 14,61        |
| 7                  | 240,60                | 1,50              | 2756,73                  | 3325,45                     | 82,90                                    | 0,0873   | 0,07452                    | 9,30          | 14,02        |
| 8                  | 607,40                | 3,50              | 2045,65                  | 2267,39                     | 90,22                                    | 0,2969   | 0,19487                    | 3,56          | 6,09         |
| 9                  | 252,00                | 4,00              | 2275,90                  | 2395,30                     | 95,02                                    | 0,1107   | 0,13478                    | 5,14          | 9,15         |
| 10                 | 114,60                | 3,00              | 1081,45                  | 1408,80                     | 76,76                                    | 0,1060   | 0,06149                    | 11,27         | 16,50        |
| 11                 | 514,90                | 3,50              | 2877,15                  | 3044,21                     | 94,51                                    | 0,1790   | 0,29771                    | 2,33          | 5,34         |
| 12                 | 408,30                | 3,00              | 2732,58                  | 2938,13                     | 93,00                                    | 0,1494   | 0,09931                    | 6,98          | 8,46         |
| 13                 | 231,60                | 3,50              | 2037,95                  | 2286,99                     | 89,11                                    | 0,1136   | 0,09729                    | 7,12          | 10,97        |
| 14                 | 264,60                | 3,50              | 1485,88                  | 1648,39                     | 90,14                                    | 0,1781   | 0,23000                    | 3,01          | 6,18         |
| 15                 | 202,90                | 1,50              | 2276,48                  | 2798,31                     | 81,35                                    | 0,0891   | 0,07192                    | 9,64          | 14,65        |
| 16                 | 400,60                | 5,00              | 2118,95                  | 2306,98                     | 91,85                                    | 0,1891   | 0,26988                    | 2,57          | 6,27         |
| 17                 | 231,80                | 2,00              | 2484,55                  | 2671,94                     | 92,99                                    | 0,0933   | 0,12249                    | 5,66          | 9,94         |
| 18                 | 268,70                | 2,00              | 2230,23                  | 2458,83                     | 90,70                                    | 0,1205   | 0,09751                    | 7,11          | 10,28        |
| 19                 | 300,30                | 2,50              | 2603,63                  | 2946,85                     | 88,35                                    | 0,1153   | 0,07955                    | 8,71          | 10,91        |
| 20                 | 203,90                | 2,00              | 1845,60                  | 2433,75                     | 75,83                                    | 0,1105   | 0,05316                    | 13,04         | 16,82        |
| 21                 | 364,50                | 3,50              | 2369,33                  | 2498,84                     | 94,82                                    | 0,1538   | 0,11066                    | 6,26          | 7,94         |
| 22                 | 398,50                | 2,50              | 1975,45                  | 2232,90                     | 88,47                                    | 0,2017   | 0,09111                    | 7,61          | 10,92        |
| 23                 | 499,20                | 3,50              | 2937,40                  | 3064,80                     | 95,84                                    | 0,1699   | 0,11894                    | 5,83          | 7,45         |
| 24                 | 186,80                | 1,50              | 1274,25                  | 1388,65                     | 91,76                                    | 0,1466   | 0,09746                    | 7,11          | 9,66         |
| <b>Ср. знач.</b>   | <b>291,81</b>         | <b>3,19</b>       | <b>2191,85</b>           | <b>2551,74</b>              | <b>86,26</b>                             | <b>0,1339</b>                                    | <b>0,11605</b>             | <b>7,52</b>   | <b>11,20</b> |
| <b>Ср. геом.</b>   | <b>268,63</b>         | <b>2,91</b>       | <b>2119,70</b>           | <b>2487,70</b>              | <b>85,21</b>                             | <b>0,1267</b>                                    | <b>0,10237</b>             | <b>6,77</b>   | <b>10,48</b> |
| <b>Медиана</b>     | <b>246,30</b>         | <b>3,00</b>       | <b>2253,06</b>           | <b>2519,59</b>              | <b>90,18</b>                             | <b>0,1145</b>                                    | <b>0,09749</b>             | <b>7,11</b>   | <b>10,17</b> |
| <b>Мин. знач.</b>  | <b>114,60</b>         | <b>1,50</b>       | <b>1081,45</b>           | <b>1388,65</b>              | <b>40,34</b>                             | <b>0,0838</b>                                    | <b>0,04631</b>             | <b>2,33</b>   | <b>5,34</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> | <b>607,40</b>         | <b>8,00</b>       | <b>3262,43</b>           | <b>3547,35</b>              | <b>95,84</b>                             | <b>0,2969</b>                                    | <b>0,29771</b>             | <b>14,97</b>  | <b>22,49</b> |
| <b>SD</b>          | <b>125,92</b>         | <b>1,48</b>       | <b>542,94</b>            | <b>546,96</b>               | <b>11,62</b>                             | <b>0,0497</b>                                    | <b>0,06657</b>             | <b>3,31</b>   | <b>4,25</b>  |
| <b>CV</b>          | <b>43,15</b>          | <b>46,44</b>      | <b>24,77</b>             | <b>21,43</b>                | <b>13,47</b>                             | <b>37,15</b>                                     | <b>57,36</b>               | <b>44,04</b>  | <b>37,97</b> |
| <b>SE</b>          | <b>25,70</b>          | <b>0,30</b>       | <b>110,83</b>            | <b>111,65</b>               | <b>2,37</b>                              | <b>0,0102</b>                                    | <b>0,01359</b>             | <b>0,68</b>   | <b>0,87</b>  |

Среднее значение соотношения  $AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}$  для мебевериновой кислоты равнялись 88,51%, для деметилированной мебевериновой кислоты - 86,26%, что указывает на достаточную длительность наблюдения. Параметры  $AUC_{0-\infty}$ ,  $K_{el}$ ,  $T_{1/2}$  и MRT для МК у добровольцев № 10, 24 не оценивались из-за недостаточного количества точек с ненулевыми зна-

чениями концентраций в фазе элиминации (Прил. 6, табл. 1). Максимальная концентрация обоих метаболитов в плазме достигается в среднем через 3 ч после приёма препарата ( $T_{\max}$  МК–  $3,27 \pm 1,03$  ч,  $T_{\max}$  ДМК–  $3,19 \pm 1,48$  ч) (табл. 4.13, 4.14), затем начинается их плавное снижение (рис. 4.5; Прил. 6, табл. 1, 2). В точке 12 ч концентрация МК в образцах всех добровольцев, кроме № 7, ниже НПКО методики (Прил. 6, табл. 1). Среднее содержание ДМК в пробах плазмы добровольцев в последней точке отбора составляет  $21,04 \pm 13,91$  нг/мл (табл. 4.14). Время наступления максимальной концентрации для обоих метаболитов достоверно не различаются ( $p=0,401$ ) (табл. 4.15).

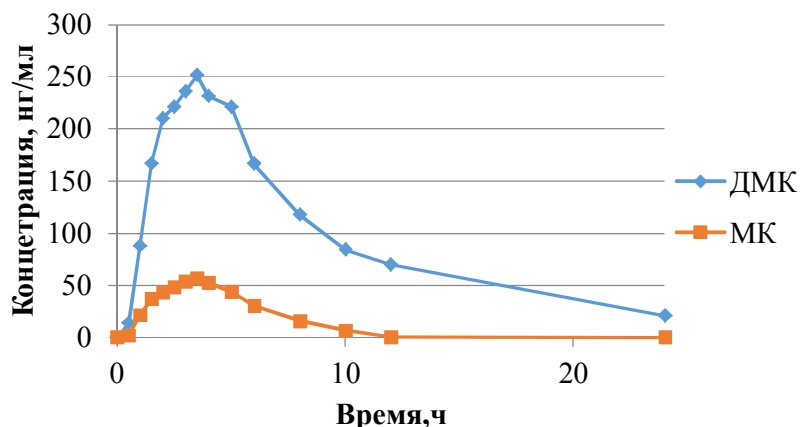


Рисунок 4.5. Усреднённые фармакокинетические кривые мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот после приёма препарата «Дюспаталин»

Таблица 4.15

Сравнение времени наступления максимальной концентрации мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови добровольцев после однократного приёма препарата Дюспаталин (Т-критерий Уилкоксона)

| Медиана |      | Т     | Z     | p     |
|---------|------|-------|-------|-------|
| МК      | ДМК  |       |       |       |
| 3,50    | 3,00 | 12,00 | 0,840 | 0,401 |

Значения таких фармакокинетических параметров, как  $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$  у ДМК значительно выше, чем у МК, следовательно ДМК является основным метаболитом мебеверина. Так, средние значения  $C_{\max}$  МК и ДМК, определяемых в плазме крови добровольцев, составили  $62,52 \pm 35,01$  и  $291,81 \pm 125,92$  нг/мл, соответственно, средние значения  $AUC_{0-t}$  -  $293,94 \pm 151,78$  и  $2191,85 \pm 542,94$  нг·ч/мл, соответственно, средние значения  $AUC_{0-\infty}$  -  $365,85 \pm 140,49$  и  $2551,74 \pm 546,96$  нг·ч/мл (табл. 4.13, 4.14) [35, 108, 110].

Таблица 4.16

Параметры корреляции концентрации мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в точках отбора проб

| Время, ч | Вид распределения (критерий Шапиро-Уилкса) |                          |       |                          | $r_s$       | p            |
|----------|--|--------------------------|-------|--------------------------|-------------|--------------|
|          | МК   |                          | ДМК   |                          |             |              |
|          | p  | Нормальное распределение | p     | Нормальное распределение |             |              |
| 0,5      | 0,000                                      | Нет                      | 0,000 | Нет                      | <b>0,54</b> | <b>0,006</b> |
| 1,0      | 0,105                                      | Да                       | 0,375 | Да                       | <b>0,73</b> | <b>0,000</b> |
| 1,5      | 0,474                                      | Да                       | 0,241 | Да                       | <b>0,70</b> | <b>0,000</b> |
| 2,0      | 0,092                                      | Да                       | 0,252 | Да                       | <b>0,44</b> | <b>0,030</b> |
| 2,5      | 0,015                                      | Нет                      | 0,105 | Да                       | <b>0,48</b> | <b>0,018</b> |
| 3,0      | 0,000                                      | Нет                      | 0,020 | Нет                      | <b>0,70</b> | <b>0,000</b> |
| 3,5      | 0,001                                      | Нет                      | 0,007 | Нет                      | <b>0,77</b> | <b>0,000</b> |
| 4,0      | 0,001                                      | Нет                      | 0,045 | Нет                      | <b>0,76</b> | <b>0,000</b> |
| 5,0      | 0,012                                      | Нет                      | 0,013 | Нет                      | <b>0,73</b> | <b>0,000</b> |
| 6,0      | 0,150                                      | Да                       | 0,385 | Да                       | <b>0,56</b> | <b>0,004</b> |
| 8,0      | 0,080                                      | Да                       | 0,212 | Да                       | <b>0,51</b> | <b>0,011</b> |
| 10,0     | 0,000                                      | Нет                      | 0,880 | Да                       | 0,38        | 0,064        |
| 12,0     | 0,000                                      | Нет                      | 0,207 | Да                       | 0,35        | 0,097        |
| 24,0     | -  | -                        | 0,134 | Да                       | -           | -            |

Таблица 4.17

Параметры корреляции основных фармакокинетических параметров мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот

| Параметр            | Вид распределения (критерий Шапиро-Уилкса) |                          |       |                          | $r_s$       | p             |
|---------------------|--|--------------------------|-------|--------------------------|-------------|---------------|
|                     | МК   |                          | ДМК   |                          |             |               |
|                     | p  | Нормальное распределение | p     | Нормальное распределение |             |               |
| $C_{max}$           | 0,001                                      | Нет                      | 0,020 | Нет                      | <b>0,58</b> | <b>0,003</b>  |
| $T_{max}$           | 0,032                                      | Нет                      | 0,003 | Нет                      | <b>0,56</b> | <b>0,005</b>  |
| $AUC_{0-t}$         | 0,154                                      | Да                       | 0,731 | Да                       | 0,39        | 0,059         |
| $AUC_{0-\infty}$    | 0,435                                      | Да                       | 0,304 | Да                       | 0,01        | 0,962         |
| $C_{max}/AUC_{0-t}$ | 0,000                                      | Нет                      | 0,001 | Нет                      | 0,32        | 0,127         |
| $K_{el}$            | 0,897                                      | Да                       | 0,002 | Нет                      | <b>0,42</b> | <b>0,0499</b> |
| $T_{1/2}$           | 0,000                                      | Нет                      | 0,363 | Да                       | <b>0,42</b> | <b>0,0499</b> |
| MRT                 | 0,000                                      | Нет                      | 0,127 | Да                       | 0,26        | 0,231         |

В половине точек фармакокинетических кривых МК и ДМК, а также у большинства фармакокинетических параметров данных метаболитов отсутствовало нормальное распределение показателей (табл 4.16, 4.17). Поэтому для проведения корреляционного анализа использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ). В результате установлена достоверная взаимосвязь между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови добровольцев в промежутке с 0,5 ч до 8,0 ч: значения  $r_s$  превышают критическое значение 0,404 (для выборки  $n=24$  и  $p=0,05$ ) [150]. При этом в точках 1,0 ч, 1,5 ч, 3,0 ч, 3,5 ч, 4,0 ч, 5,0 ч присутствует сильная корреляция, в точках 0,5 ч, 2,5 ч, 6,0 ч, 8,0 ч – корреляция средней силы. В более поздних точках фармакокинетической кривой концентрация МК в большинстве образцов плазмы ниже НПКО, поэтому достоверная

корреляция не была установлена (табл. 4.16). Рассчитанные значения  $r_s$  для параметров  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $K_{el}$ ,  $T_{1/2}$  превышают критическое значение, что свидетельствует о наличии достоверной корреляции средней силы (табл. 4.17). Величина  $r_s$  для  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}/AUC_{0-t}$ ,  $MRT$  ниже критической, однако уровень достоверности полученных результатов низкий ( $p > 0,05$ ).

Полученные значения фармакокинетических параметров ДМК существенно отличаются от данных ранее опубликованного исследования (табл. 4.18) [179]. Так, рассчитанные средние геометрические  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  приблизительно в 2 раза ниже, а измеренный период полувыведения на 2 ч дольше, чем по данным литературы. Значение коэффициента вариации  $C_{max}$  в 2 раза больше, чем опубликованное значение. Для параметров  $K_{el}$  и  $T_{1/2}$  значения  $CV$  составили 57,36% и 44,04%, соответственно, а согласно [179] величина  $CV$  данных параметров не превышает 1%.

Таблица 4.18

Сравнение полученных значений фармакокинетических параметров деметилированной мебеверинового кислоты с данными литературы

| Параметр                   | Полученное значение |       | Опубликованное значение |       |
|----------------------------|---------------------|-------|-------------------------|-------|
|                            | Сред. геом.         | CV, % | Сред. геом.             | CV, % |
| $C_{max}$ , нг/мл          | 268,63              | 43,15 | 679                     | 26,3  |
| $T_{max}$ , ч              | 2,91                | 46,44 | 2,92                    | 0,29  |
| $AUC_{0-t}$ , нг·ч/мл      | 2119,70             | 24,77 | 4553                    | 25,7  |
| $AUC_{0-\infty}$ , нг·ч/мл | 2487,70             | 21,43 | 4863                    | 25,2  |
| $K_{el}$                   | 0,10237             | 57,36 | 0,147                   | 0,027 |
| $T_{1/2}$ , ч              | 6,77                | 44,04 | 4,91                    | 1,05  |

Указанные выше различия могут быть связаны с ошибками при разработке методики определения. Winsemius A. с соавторами [179] был использован метод ВЭЖХ-УФ, который является менее селективным, чем метод ВЭЖХ-МС/МС: в некоторых случаях на хроматограммах в области времени удерживания ДМК могли присутствовать хроматографические пики эндогенных соединений, что давало завышенный результат. Кроме того, авторами не приведены данные о подтверждении селективности методики по отношению к МК, МС и другим минорным метаболитам мебеверина.

### Выводы по главе

1. Предложенная ВЭЖХ-МС/МС-методика определения МФК в плазме крови пригодна для исследования биоэквивалентности препаратов микофеноловой кислоты, т.к.



величина НПКО 0,5 мкг/мл позволяет рассчитать основные фармакокинетические параметры таблеток микофенолатат натрия, покрытых оболочкой, необходимые для оценки эквивалентности воспроизведённого препарата оригинальному ( $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ). При необходимости расчёта таких фармакокинетических параметров МФК, как  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $K_{el}$ , MRT, целесообразно более чувствительные методики. Для этого могут быть использованы разработанные ВЭЖХ-МС и ГХ-МС-методики с уровнем НПКО 0,05 мкг/мл.

2. По результатам проведённого исследования БЭ следует заключить, что тестируемый препарат микофенолата натрия не может быть признан эквивалентным референтному препарату «Майфортик».

3. В результате проведённого исследования БЭ установлено, что тестируемый препарат метилдопы является биоэквивалентным референтному препарату «Допегит» («ЭГИС», Венгрия).

4. Время наступления максимальной концентрации мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме достоверно не различаются. Между концентрациями данных метаболитов в плазме крови в интервале от 0,5 до 8,0 ч после приёма препарата «Дюспаталин», а также их фармакокинетическими параметрами  $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $K_{el}$  присутствует достоверная положительная корреляция.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях является важной составляющей, гарантирующей получение достоверных результатов фармакокинетических исследований. Так, вынесение ошибочного заключения о биоэквивалентности воспроизведённого и оригинального препарата приводит к появлению на рынке лекарственного средства, не отвечающего требованиям эффективности и безопасности. Неверный расчёт фармакокинетических параметров ЛП при клинических исследованиях I фазы влечёт за собой выбор неправильной периодичности приёма. Ошибки в ходе проведения терапевтического лекарственного мониторинга могут послужить причиной неверного выбора дозировки, что подвергает значительному риску здоровье пациентов. Поэтому исследования стабильности аналита и обратной конверсии его метаболитов являются важной частью разработки и валидации методики.

ВЭЖХ-МС/МС-методика определения МФК использована для изучения БЭ препаратов микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой. Проведённые испытания на модельных смесях, повторный анализ образцов, полученных от крыс и добровольцев свидетельствуют об отсутствии влияния обратной конверсии ФГМФК и АГМФК на точность количественного определения данного аналита в плазме. Значение  $C_{\max}$  МФК после приёма референтного препарата составило  $12,29 \pm 5,53$  мкг/мл (табл. 4.1), следовательно, выбранное значение НПКО находится ниже, чем 5% от  $C_{\max}$ . Таким образом, величина НПКО, установленного на уровне 0,5 мкг/мл, достаточно для изучения биоэквивалентности МФН. Такой же уровень НПКО установлен для проведения исследований биоэквивалентности [149, 174] и терапевтического лекарственного мониторинга [74] препаратов МФК. Однако, при необходимости расчёта таких фармакокинетических параметров, как  $K_{el}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{1/2}$ , MRT, необходимо использовать более чувствительные методики. Так, в разработанных ВЭЖХ-МС и ГХ-МС-методиках нижний предел количественного определения был установлен на уровне 0,05 мкг/мл, как в большинстве методик определения данного аналита в биологических жидкостях [45, 50, 115, 116, 128, 155]. Время одного анализа при ВЭЖХ-МС-определении микофеноловой кислоты составляет 5 мин, что значительно быстрее, чем в методиках [50, 62, 136, 137, 156, 178, 188]. Использование депротеинизации позволяет значительно ускорить процесс пробоподготовки в сравнении с работами зарубежных авторов [45, 48, 50, 67, 115, 128,

136, 143, 145, 188]. Сопоставимый с ВЭЖХ-МС/МС уровень чувствительности и экспрессности делает применение данной методики для исследований БЭ и ТЛМ более предпочтительным, чем применение разработанных ранее методик [45, 48, 50, 67, 115, 128, 136, 143, 145, 188]. Метод ГХ-МС при определении концентрации МФК в плазме позволяет также одновременно проводить идентификацию большинства лекарственных веществ по их масс-спектрам [5, 25, 26, 40]. При изучении БЭ это даёт дополнительную возможность контроля соблюдения добровольцами протокола исследования. Так, наличие в крови испытуемого других ЛВ может повлиять на фармакокинетику изучаемого препарата, и поэтому является поводом для исключения его результатов из статистических расчётов [22, 24, 86, 88]. Применение масс-спектрометрического детектирования также значительно увеличивает селективность методики. Использование спектрофотометрического и флюориметрического детектирования не позволяет полностью гарантировать отсутствие влияния ко-элюирующихся с аналитом соединений на точность его определения [25, 26, 40, 152].

Полученные в ходе исследования биоэквивалентности значения фармакокинетических параметров МФК свидетельствуют о более быстрой абсорбции действующего вещества после приёма тестируемого препарата, и, как следствие, о более высокой концентрации действующего вещества в плазме крови. Результаты дисперсионного анализа свидетельствуют, изучаемый препарат вносит значительный вклад в вариабельность  $C_{\max}$  и  $C_{\max}/AUC_{0-t}$  (табл. 4.5). Поэтому дополнительный набор добровольцев или использование репликативного дизайна в данном случае не целесообразно. На биодоступность лекарственных веществ, главным образом, влияют их физико-химические свойства и состав вспомогательных веществ. Такие характеристики АФС, как полиморфная модификация, степень измельчения, форма частиц, растворимость и остаточная влажность являются наиболее значимыми [3].

Полиморфизм – способность вещества находится в нескольких кристаллических формах с различными физико-химическими свойствами [7]. Так, субстанция микофенолата натрия способна образовывать полиморфные модификации (в т.ч. аморфную форму), имеющие разные температуры плавления [130]. Однако, данные отличия не могли повлиять на растворимость и биодоступность действующего вещества.

На растворимость действующего вещества влияет использование его разных солей, сложных эфиров, а также включение в состав вспомогательных веществ солюбили-

заторов [26, 40]. Так, хинина гидрохлорид является легко растворимым в воде, а хинина сульфат в ней практически не растворяется, что сказывается на отличии в их биодоступности [26]. Применение субстанции эритромицина пропионата в составе таблеток и капсул позволяет увеличить концентрации антибиотика в крови в 2-4 раза, по сравнению с его основанием [3, 40]. Однако, в состав изучаемых препаратов входила одинаковая субстанция микофенолата натрия, и солюбилизаторы не использовались.

Степень измельчения напрямую влияет на растворимость субстанции. Известно, что уменьшение размера частиц увеличивает растворимость и, как следствие, ускоряет абсорбцию действующего вещества. Размер и форма частиц также определяют такие технологические характеристики АФС, как сыпучесть, прессуемость, насыпная масса и удельная поверхность. Так, субстанции индапамида и лоратадина, имеющие анизометрическую форму, или преднизолон, имеющий изометрическую форму, обладают низкой сыпучестью, а феназепам, имеющий округлую форму, и анаприлин, имеющий симметричную призматическую форму частиц, обладают высокими показателями сыпучести [7, 40]. Различия данных параметров АФС требуют оптимизации технологического процесса, что может привести к получению лекарственного препарата с несколько другими показателями механической прочности и распадаемости, и, следовательно, другой биодоступностью.

Технология получения лекарственной формы сильно влияет на фармакокинетические параметры действующего вещества. Так, при использовании различных способов грануляции (влажной и сухой грануляции, грануляции в псевдосжиженном слое, грануляции с большим усилием сдвига) получают частицы с различной морфологией (формой, размером и т.д.), что приводит к различной растворимости, и, как следствие, к различной биодоступности ДВ [2, 3]. Кроме того, технология изготовления оригинального препарата, либо полностью неизвестна, либо защищена рядом патентов. При его производстве также применяется другое технологическое оборудование и сырьё, что требует дополнительной оптимизации параметров технологического процесса. Поэтому использование полностью идентичной технологии при производстве воспроизведённого препарата невозможно. Это влияет на появление различий между фармакокинетическими параметрами тестируемого или референтного препарата.

Вспомогательные вещества в существенной степени влияют на скорость и полностью высвобождения лекарственного вещества из лекарственной формы и, соответственно,

скорость его всасывания. Так, лактоза ускоряет абсорбцию тестостерона, увеличивает высвобождение аскорбиновой кислоты из гранулированной лекарственной формы. Некоторые скользящие вещества, такие как тальк, стеараты, высшие углеводороды, ухудшают распадаемость таблетки за счёт затруднения проникновения в её структуру пищеварительных соков [3, 26]. Поэтому их избыточное добавление может приводить к замедлению всасывания действующего вещества и, как следствие, получению неэквивалентного препарата. Состав исследуемых таблеток представлен в таблице 5.1.

Таблица 5.1

## Составы тестируемого и референтного препарата

| Компонент                  | Содержание в таблетке, мг |             | Вид вспомогательного вещества |
|----------------------------|---------------------------|-------------|-------------------------------|
|                            | T                         | R           |                               |
| <b>Ядро таблетки</b>       |                           |             |                               |
| микофенолат натрия         | 384,8                     | 384,8       | Действующее вещество          |
| лактозы моногидрат         | 122,50                    | -           | Наполнитель                   |
| лактоза безводная          | -                         | 90,0        | Наполнитель                   |
| крахмал кукурузный         | <b>60,0</b>               | <b>20,5</b> | Дезинтегрант                  |
| повидон                    | <b>0,8</b>                | <b>40,0</b> | Связующее вещество            |
| кросс-повидон              | <b>30,0</b>               | <b>65,0</b> | Связующее вещество            |
| кремния диоксид коллоидный | 8,0                       | 13,2        | Антифрикционное вещество      |
| магния стеарат             | 5,0                       | 6,5         | Антифрикционное вещество      |
| <b>Оболочка</b>            |                           |             |                               |
| гипромеллозы фталат        | 40,00                     | 65,0        | Плёнкообразователь            |
| диэтилфталат               | 5,33                      | -           | Плёнкообразователь            |
| титана диоксид             | 5,33                      | 4,666       | Краситель                     |
| железа оксид красный       | -                         | 0,167       | Краситель                     |

Как видно из данных, представленных в табл. 5.1, содержание кукурузного крахмала – дезинтегранта, ускоряющего распадаемость таблеток, в тестируемом препарате в 3 раза больше, чем в референтном, а содержание связующих веществ, повидона и кросс-повидона, значительно ниже. Кроме того, содержание основного компонента оболочки, гипромеллозы фталата, в исследуемом препарате примерно в 1,5 раза ниже, что также способствует более быстрому всасыванию микофеноловой кислоты. Содержание магния стеарата, который способен замедлять высвобождение действующего вещества [26], в составе референтного препарата на 1,5 мг выше, что также могло послужить причиной более плавного нарастания концентрации МФК с достижением меньших уровней  $C_{max}$  после его приёма.

Таким образом, различия в составе вспомогательных веществ являются одной из основных причин получения неэквивалентных результатов проведённого исследования. Также нельзя исключать влияние отличий в технологии изготовления и технологиче-

ских свойствах АФС, а именно степени измельчения, форме частиц, сыпучести, прессуемости, насыпной массе и удельной поверхности у тестируемого и референтного препарата.

Разработанная методика количественного определения **метилдопы** в плазме крови была успешно апробирована при изучении биоэквивалентности её таблетированных форм. Применение метода осаждения белка позволило существенно ускорить и упростить процесс пробоподготовки по сравнению с ЖЖЭ и ТФЭ, использованных в других аналогичных исследованиях [49, 138, 166]. Время хромато-масс-спектрометрического определения составило 8 мин. Это существенно дольше, чем в методиках С.Н. Oliveira с соавторами [138]; G. Bahrami с соавторами [49]; H. Valizadeh с соавторами [166]; L. Vlase с соавторами [172]: время одного анализа - 3,4 мин, 1,7 мин, 3,0 мин, 1,05 мин, соответственно. Однако, в данных исследованиях не были использованы антиоксиданты, которые необходимы для предотвращения окисления метилдопы. Добавление раствора стабилизатора к плазме требует изменения программы хроматографического разделения для устранения усиливающихся при этом матричных эффектов [152]. Применение двумерной хроматографии также позволяет уменьшить загрязнение источника ионов и ионной оптики в масс-спектрометрическом детекторе за счёт элюирования большей части добавленного стабилизатора до переключения потока на вторую колонку (рис. 3.30). Поэтому более сложная и длительная программа хроматографического разделения компонентов пробы в данном случае является обоснованной. Величина  $C_{\max}$  метилдопы после приёма референтного препарата составила  $1,233 \pm 0,419$  мкг/мл, следовательно выбранный НПКО методики находится значительно ниже, чем требуемые для проведения исследований биоэквивалентности 5% от  $C_{\max}$ .

Полученные в ходе исследования биоэквивалентности значения фармакокинетических параметров метилдопы после приёма препарата «Допегит» практически совпадают с данными K. Rona с соавторами [151], однако приблизительно в 1,5 раза выше, чем значения ФК параметров, рассчитанные в исследовании [166] за исключением периода полувыведения – он в 2,5 раза короче. Это может быть связано с тем, что после отбора образцов крови к плазме не был добавлен стабилизатор, и метилдопа подверглась частичному разложению, что привело к получению заниженных концентраций. Коэффициент внутрисубъектной вариабельности параметра  $C_{\max}$  составил в проведенном исследовании 33,10%, что соответствует уровню высоковариабельного лекарственного препарата. Это позволяет устанавливать более

широкие границы доверительного интервала геометрического среднего для данного параметра 77,23 – 129,48%.

Методика количественного определения **мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот** была использована для исследования фармакокинетики препарата «Дюспаталин», в ходе которого была установлена достоверная корреляция между концентрациями данных метаболитов в плазме. В рамках разработки методики была впервые изучена обратная конверсия фенольного глюкуронида ДМК в процессе хранения и выполнения хромато-масс-спектрометрического определения. Преимуществами данной методики по сравнению с методиками [105, 131] является более простой и экспрессный способ подготовки проб (осаждение белков без концентрирования), а также более короткое время анализа: на 0,5 мин меньше, чем в работе N. Moskaleva с соавторами [131], на 2,5 мин меньше, чем в работе С. Khatri [105]. Кроме того, НПКО определения МК и ДМК на уровне 10 нг/мл в 10 раз ниже, чем в исследовании [105]. В других методиках [77, 160] для пробоподготовки применяется длительная процедура ЖЖЭ и используются менее селективные методы анализа (ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ с кулонометрическим детектированием). Также в данных методиках не предусмотрено определение ДМК, которая является основным метаболитом мебеверина.

Рассчитанное значение  $C_{\max}$  для ДМК составило  $291,81 \pm 125,92$  нг/мл, следовательно, выбранный уровень НПКО находится ниже, чем 5% от  $C_{\max}$ . Для МК данное соотношение не соблюдается: значение НПКО в 3 раза выше, чем 5% от  $C_{\max}$ , что считается недостаточным для изучения БЭ. Таким образом, при изучении БЭ уровень НПКО для МК необходимо снизить, как минимум, до 3 нг/мл, проведя при этом частичную валидацию. Согласно требованиям нормативной документации [22, 24, 86, 88] в случае, если концентрация лекарственного вещества в биологических жидкостях достаточно низкая, допускается оценивать биоэквивалентность по основному метаболиту без определения ЛВ. Как показали результаты исследования фармакокинетики, мебевериновая кислота является минорным метаболитом мебеверина по отношению к ДМК и между концентрациями их имеется статистически достоверная положительная корреляция в промежутке от 0,5 до 8,0 ч после приёма препарата. Поэтому оценку БЭ лекарственных препаратов мебеверина можно проводить, опираясь на значения ФК параметров только деметилированной мебевериновой кислоты без необходимости определения МК. Аналогичной точки зрения придерживаются М. Bergenon с соавторами [52], N.E. Moskaleva с соавторами [131], А. Winsemius с соавторами [179].

Таким образом, созданный на примере методик измерения концентрации веществ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и образующих в процессе метаболизма глюкурониды, в плазме подход к разработке биоаналитических методик пригоден для изучения других классов нестабильных соединений (табл. 3.31). Использование предложенного подхода позволяет избежать получения ложных результатов измерения концентрации изучаемых веществ в рамках фармакокинетических исследований. Это значительно уменьшает риск для здоровья пациентов при приёме как оригинальных, так и воспроизведённых препаратов или применении результатов терапевтического лекарственного мониторинга.



## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

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

6. Тестируемый препарат метилдопы биоэквивалентен референтному препарату «Допегит». Значения геометрических средних отношений параметров  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC_{0-t}$  изучаемых препаратов и их 90%-ые доверительные интервалы отношений укладываются в диапазон 80,00 – 125,00%.
7. Анализ результатов изучения фармакокинетики препарата «Дюспаталин» показал, между концентрациями мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислоты в плазме крови в период с 0,5 ч по 8,0 ч после приёма ЛП установлена достоверная положительная корреляция. Время наступления максимальной концентрации данных метаболитов в плазме достоверно не различаются. Это позволяет проводить оценку биоэквивалентности препаратов мебеверина, опираясь на сравнение фармакокинетических параметров деметилированной мебевериновой кислоты.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При снижении НПКО методики определения микофеноловой кислоты необходимо повторить изучение обратной конверсии её фенольного глюкуронида в процессе хранения для корректировки максимального времени хранения при комнатной температуре.
2. В случае применения для пробоподготовки метода осаждения белков при исследованиях микофеноловой кислоты, метилдопы, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в качестве осадителя следует использовать метанол.
3. Если для количественного определения микофеноловой кислоты в плазме в качестве метода подготовки проб выбрана жидкостно-жидкостная экстракция, то при этом рекомендуется проводить коррекцию рН до 2,0 и в качестве экстрагента использовать дихлорметан.
4. Биоаналитические исследования препаратов метилдопы целесообразно проводить с применением двумерной хроматографии в целях элюирования большей части стабилизатора до попадания в источник ионов. При этом рекомендуется использовать следующие хроматографические колонки: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (50\*3,0 мм, 5 мкм) и Phenomenex Synergi Fusion – RP 80A (150\*4,6 мм, 4 мкм).
5. Определение мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме рекомендуется выполнять с применением двумерной хроматографии для улучшения соотношения «сигнал/шум» и, как следствие, чувствительности методики. При этом возможно использовать следующие хроматографические колонки: Luna C<sub>8</sub> Mercury (20\*4,0 мм, 5 мкм) и Luna C8 (150\*4,6 мм, 5 мкм).

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГМФК – О-ацилглюкуронид микофеноловая кислоты  
АФС — активная фармацевтическая субстанция  
БР – буферный раствор  
БЭ — биоэквивалентность  
ВПКО – верхний предел количественного определения  
ВС – внутренний стандарт  
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ-УФ - со спектрофотометрическим детектированием
  - ВЭЖХ-ФД - с флуориметрическим детектированием
  - ВЭЖХ-МС - с масс-спектрометрическим детектированием
  - ВЭЖХ-МС/МС - с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
- ГРЛС – государственный реестр лекарственных средств  
ГХ-МС — газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием  
ГХ-МС/МС — газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
- ДВ — действующее вещество  
ДИ - доверительный интервал  
ДМК – деметилированная мебевериновая кислота  
ДМК –D<sub>5</sub> — дейтерированный внутренний стандарт деметилированной мебевериновой кислоты  
ЕАЭС - Евразийский экономический союз  
ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция  
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт  
ЖНВЛП - жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты  
ИМТ — индекс массы тела  
КИ — клиническое исследование  
КП — коэффициент пересчета  
КЭ — капиллярный электрофорез  
ЛВ — лекарственное вещество  
ЛП — лекарственный препарат  
ЛС — лекарственное средство  
ЛФ — лекарственная форма  
МБ- мебеверин  
МД — метилдопа  
МД-D<sub>5</sub> — дейтерированный внутренний стандарт метилдопы  
МК – мебевериновая кислота  
МК–D<sub>5</sub> — дейтерированный внутренний стандарт мебевериновой кислоты  
МС – мебевериновый спирт  
МФК – микофеноловая кислота  
МФК-TMS – ди-TMS-производное микофеноловой кислоты  
МФК-D<sub>3</sub> — дейтерированный внутренний стандарт микофеноловой кислоты  
МФМ – микофенолата мофетил  
МФН – микофенолат натрия  
МХ - метиленхлорид  
НПКО — нижний предел количественного определения

ПП – осаждение белков  
ПФ — подвижная фаза  
СИ – степень извлечения  
ТЛМ - терапевтический лекарственный мониторинг  
ТФЭ - твердофазная экстракция  
УЭЖХ — ультраэффективная жидкостная хроматография  
ФГДМК – фенольный глюкуронид деметилированной мебевериновой кислоты  
ФГМФК – фенольный глюкуронид микофеноловая кислоты  
ФК — фармакокинетика  
APCI - химическая ионизация при атмосферном давлении  
BSTFA - N,O- бис (триметилсилил)-трифторацетамид  
CV<sub>intra</sub> - коэффициент внутрисубъектной вариабельности  
EMA — European Medicines Agency (Европейское медицинское агенство)  
ESI – электрораспылительная ионизация  
FDA — Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)  
FIA - flow injection analysis  
ISR-тест – повторный анализ проанализированных ранее образцов (Incurred samples reanalysis)  
LQC – образец контроля качества нижнего уровня концентраций  
L95 – нижняя граница 95% доверительного интервала  
MF– фактор матрицы  
MRM - Multiple reaction monitoring (Мониторинг множественных реакций)  
MQC – образец контроля качества среднего уровня концентраций  
NMF – нормализованный фактор матрицы  
HQC – образец контроля качества верхнего уровня концентраций  
H95 – верхняя граница 95% доверительного интервала  
R — референтный препарат  
S пика – площадь хроматографического пика  
SE – стандартная ошибка среднего  
SIM - Selected ion monitoring (Мониторинг выбранного иона)  
Т — тестируемый препарат  
TMCS –триметилхлорсилан  
t<sub>R</sub>- время удерживания

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Верлан, Н.В. Взаимозаменяемость лекарств с позиций фармацевтического соответствия и клинической эффективности и безопасности / Н.В. Верлан, Г.А. Ковальская, Д.Я. Жукова [и др.] // Качественная клиническая практика. – 2016. - №3. - с. 66-72.
2. Гильдеева, Г.Н. Исследования биоэквивалентности как способ оценки взаимозаменяемости лекарственных препаратов: проблемы и ограничения / Г.Н. Гильдеева, А.В. Белостоцкий, В.В. Смирнов // Вестник фармаконадзора. – 2016. – №2.- с 46 - 49.
3. Гильдеева, Г.Н. Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов: докт. дисс. ... доктора фармацевт. н. – М., 2017. – 358 с.
4. Государственная фармакопея СССР. X издание. – М.: Медицина, 1968. – 1081 с.
5. Григорьев, А.М. Хроматомасс-спектрометрические методы выявления метаболитов лекарственных средств и синтетических каннабиномиметиков / докт. дисс. ... доктора хим. н.: 12.00.02 / А.М. Григорьев – М., 2016. – 321 с.
6. Гуськова, Т.А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований / Т.А. Гуськова // Токсикологический вестник. – 2010. –Т. 104, №5. – с. 2-6.
7. Емшанова, С.В. Обеспечение качества отечественных лекарственных средств (оптимизация технологии и совершенствование стандартизации таблетированных лекарственных форм): автореф. докт. дисс. доктора фармацевт. н.: 15.00.01, 15.00.02 / С.В. Емшанова. – М., 2007. –47 с.
8. Еремина, Н.В. Сравнительное исследование фармакокинетики и биораспределения карбазольного соединения СВL0100 в составе различных топических лекарственных форм на морских свинках / Н.В. Еремина, В.И. Казей, О.Ю. Кравцова [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2016. – №1. – с. 38 – 43.
9. Жердев, В.П. Роль фармакокинетических и биофармацевтических исследований при создании новых дипептидных лекарственных средств (экспериментальное исследование) / В.П. Жердев, С.С. Бойко, Р.В. Шевченко [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2017. – №1. – с. 3 – 10.

10. Жердев, В.П. Сравнительное изучение фармакокинетики метаболита тропоксина у различных видов животных и человека / В.П. Жердев, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2017. – №2. – с. 30 – 34.
11. Информационно-аналитический бюллетень № 12. Итоги 2015 [Электронный ресурс] / Ассоциация Организаций по Клиническим Исследованиям. – 2016. - Режим доступа: [http://acto-russia.org/files/bulletin\\_12.pdf](http://acto-russia.org/files/bulletin_12.pdf).
12. Информационно-аналитический бюллетень № 16. Итоги 2017 [Электронный ресурс] / Ассоциация Организаций по Клиническим Исследованиям. – 2018. - Режим доступа: [http://acto-russia.org/files/bulletin\\_14.pdf](http://acto-russia.org/files/bulletin_14.pdf).
13. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертензии у беременных. – М., 2010. – 84 с.
14. Лакин, К.М. Биотрансформация лекарственных веществ: монография / К.М. Лакин, Ю.Ф. Крылов.- М.: Медицина, 1981. –342 с.
15. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии: А.Т. Лебедев. -М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. - 493 с., ил. - ISBN 5-94774-052-4.
16. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды: А.Т. Лебедев. - М.: Техносфера, 2013. - 632 с. – ISBN 978-5-94836-363-9.
17. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. Справочник. / М.Д. Машковский - 16-е изд.- М.: Новая Волна, 2017. - 1216 с.
18. Меньшикова, Л.А. Фармакокинетическое исследование оригинального лекарственного средства тиозонида: канд. дисс. ... кандидата фармацевт. н.: 14.04.02 / Л.А. Меньшикова – М., 2016. – 117 с.
19. Метилдопа: запрос в Государственном реестре лекарственных средств // Государственный реестр лекарственных средств. - 2015. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BB%D0%B4%D0%BE%D0%BF%D0%B0>.
20. Надлежащая клиническая практика: Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005. -2005.- Режим доступа: [base.garant.ru/12146180/](http://base.garant.ru/12146180/).
21. Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств / Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81. – 2016. - Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/456026101>.

22. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза / Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85. – 2016. - Режим доступа: <http://docs.pravo.ru/document/view/89453867/102662693/>.
23. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: Методические указания ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». – М., 2008. - Режим доступа: <http://rdg-cro.com/wp-content/uploads/2012/07/Guidelines-for-conducting-bioequivalence-studies-in-Russia.pdf>.
24. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. / А.Н. Миронов [и др.]- М.: Гриф и К, 2013. – 328 с.
25. Савчук, С.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике: С.А. Савчук, А.М. Григорьев. - М.: ЛЕНАНД, 2013. - 224 с.
26. Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов / А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес [и др.]; под ред. А.Л. Хохлова. – М.: РАН, 2018. – 244 с.
27. Смирнова, Л.А. Абсолютная и относительная биодоступность нового производного глутаминовой кислоты – глутарона / Л.А Смирнова, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, №12. – с. 23-25.
28. Смирнова, Л.А. Фармакокинетические свойства нового производного аденина с противовирусной активностью / Л.А Смирнова, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха [и др.] // Вестник ВолгГМУ. - 2014. - Т. 49, №1. - с. 92-93.
29. Спасов, А. А. Абсолютная биодоступность производного морфолиноэтилимидазо-бензимидазола у крыс / А. А. Спасов, Л. А. Смирнова, А. И. Ращенко [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 1. - С. 17-19.
30. Сычёв, К.С. Практический курс жидкостной хроматографии. – М.: КОКОРО, 2013. – 272 с. – I SBN 978-5-9902902-2-8.
31. Тюренков, И.Н. Фармакокинетические свойства нового производного ГАМК цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова, Л. А. Смирнова [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2012. – №2. – с. 26 – 29.
32. Хохлов, А.Л. Анализ качества проведения исследований биоэквивалентности и фармакокинетики в России / А.Л. Хохлов, Е.Г. Лилеева // Качественная клиническая



практика. – 2016. – №2. – с. 64-70.

33. Хохлов, А.Л. Значение фармакогенетических исследований при различных формах ишемической болезни сердца: Монография / А.Л. Хохлов, Н.О. Поздняков, Ю.В. Рыбачкова. – Ярославль: Ремдер, 2016. - 188 с.

34. Хохлов, А.Л. Исследование сравнительной фармакокинетики таблетированных форм микофеноловой кислоты / А.Л. Хохлов, И.И. Яичков, А.М. Шитова [и др.] // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2017. - №1. - С. 57-62.

35. Хохлов, А.Л. Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением / А.Л. Хохлов, Л.Н. Шитов, И.И. Яичков [и др.] // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2017. - №4. - С. 3-8.

36. Хохлов, А.Л. Количественное определение микофеноловой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием / А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко, Л.Н. Шитов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2017. -Т. 51, № 6. – с. 58-61.

37. Хохлов, А.Л. Методика количественного определения метилдопы в плазме крови человека / А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко, V. Kubes [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2017. – Т.63, № 3. - С. 105-108.

38. Хохлов, А.Л. Подходы к фармакогенетическим исследованиям заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена и атеросклероза: Монография / А.Л. Хохлов, В.Г. Кукес, Д.А. Сычёв.- М., Ярославль, 2016. - 428 с.

39. Хохлов, А.Л. Проблемы проведения биоаналитической части исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в России / А.Л. Хохлов, Е.Г. Лилеева, О.А. Синицина [и др.]. // Фармакокинетика Фармакодинамика. – 2014. - №1. – с. 37-43.

40. Хохлов А.Л. (ред.) Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведённых лекарственных препаратов: монография / А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес [и др.]. - Фотолайф: Москва - Ярославль – Прага, 2017. - 227 с.

41. Хохлов, А.Л. Фармакокинетические свойства и биоэквивалентность препаратов метилдопы: результаты открытого рандомизированного двухэтапного перекрестного исследования с однократным приемом / А.Л. Хохлов, Л.Н. Шитов, М. Ryska [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2016. – Т. 25, №4. – с. 7-12.

42. Яичков, И.И. Основные ошибки в аналитической части исследований биоэквивалентности и фармакокинетики / И.И. Яичков, Ю.А. Джурко, Л.Н. Шитов // Медицинская этика. – 2018. – Т.6, № 1. – С. 33-38.
43. Яичков, И.И. Способы стабилизации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях при биоаналитических исследованиях (Обзор) / И.И. Яичков, А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. - №2. – С. 160 -164.
44. Abu-Shandi, K.H. Quantification and Stability Evaluation of the Highly Specific Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor in Human Plasma Using a Gas Chromatography Method with N,N,N',N'-teteramethyl-2-butenediamine Derivatizing Agent / K.H. Abu-Shandi, E. Redel // Jordan Journal of Chemistry. - 2009. – V. 4, №2 - p. 183-194.
45. Almeida, S. Mycophenolate mofetil 500-mg tablet under fasting conditions: single-dose, randomized-sequence, open-label, four-way replicate crossover, bioequivalence study in healthy subjects / S. Almeida, A. Filipe, R. Neves, [et al.] // Clinical Therapeutics. –2010. - V. 32, №3. - p. 556–574.
46. Alnaizy, R. Advanced oxidation of phenolic compounds / R. Alnaizy, A. Akgermanu // Advances in Environmental Research. -2000. – V.4, №3. - P.233-244.
47. Argikar, U.A. Unusual Glucuronides / U.A. Argikar // Drug metabolism and disposition. – 2012. – V. 40, №7. – p. 1239 - 1251.
48. Bahrami, G. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid–liquid extraction: Application to human pharmacokinetic studies / G. Bahrami, B. Mohammadi // Clinica Chimica Acta. – 2006. –V. 370, №1-2. –p. 185-190.
49. Bahrami, G. A rapid high performance liquid chromatographic determination of methyldopa in human serum with fluorescence detection and alumina extraction: Application to a bioequivalence study/ G. Bahrami, A. Kiani, S. Mirzaeei // Journal of Chromatography B. - 2006. –V.64, № 3. - p. 238-245.
50. Benoit-Biancamano, M.O. Sensitive high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma and urine / M.O. Benoit-Biancamano, P. Caron, E. Levesque [et al.] // Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. - 2007. – V. 832. -p. 197–201.

51. Benech, H. Development and validation of an LC/MS/MS assay for mycophenolic acid in human peripheral blood mononuclear cells / H. Benech, S. Hascoet, V. Furlan [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2007. -V. 853, № 1-2. - p. 168–174.
52. Bergeron, M. Use of polarity switching for the simultaneous bioanalysis of analytes with three orders of magnitude difference in concentration by HPLC-MS/MS / M. Bergeron, A. Bergeron, P. Amsterdam [et al.] // *Bioanalysis*. – 2013. – V.15, № 5. – p. 1911-1918.
53. Bittersohl, H. Simultaneous Determination of Protein-Unbound Cyclosporine A and Mycophenolic Acid in Kidney Transplant Patients Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / H. Bittersohl, J. Herbinger, M. Wen // *Therapeutic Drug Monitoring*.- 2017. –V.39, №3. – p. 211-219.
54. Blanchet, B. Comparison of a new enzymatic assay with a high-performance liquid chromatography/ultraviolet detection method for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in adult liver transplant recipients / B. Blanchet, F. Taieb, F. Conti [et al.] // *Liver Transplantation*. – 2008. - V.14, №12. – p. 1745–1751.
55. Boer, K. Automated monitoring of C2 and C0 blood levels of mycophenolic acid and cyclosporine on the Abbott Architect c8000 / K. Boer, S. Brehmer-Streck, T. Deufel [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2007. - V. 40, №15. - p. 1163–1167.
56. Brandhorst, G. Quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry of mycophenolic acid and its phenol and acyl glucuronide metabolites / G. Brandhorst, F. Streit, S. Goetze [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2006. - V. 52, №10. - p. 1962–1964.
57. Brêtas, J.M. Development and validation of an LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of naproxen and sumatriptan in human plasma: application to a pharmacokinetic study / J.M. Brêtas, I.C. César, C.M. Brêtas [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2016. – V.408, №15. – p. 3981-3992.
58. Briscoe, C.J. Factors affecting the stability of drugs and drug metabolites in biological matrices / C.J. Briscoe, D.S. Hage // *Bioanalysis*. – 2009. – V.1, №1. – p. 205-220.
59. Brown, C.M. Drug Treatment of Hypertension in Pregnancy / C.M. Brown , V.D. Garovic // *Drugs*.- 2014. – V.74, №3. – p. 283–296.
60. Buchwald A. Validation of an LC–MS/MS method to determine five immunosuppressants with deuterated internal standards including MPA / A. Buchwald, K. Winkler, T. Epting // *BMC Clinical Pharmacology*.- 2012. – V.12, №2. – Режим доступа: [bmcclinpharma.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6904-12-2](http://bmcclinpharma.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6904-12-2).

61. Cardoso, E. Quantification of the next-generation oral anti-tumor drugs dabrafenib, trametinib, vemurafenib, cobimetinib, pazopanib, regorafenib and two metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / E. Cardoso, T. Mercier, A.D. Wagner [et al.] // *Journal of chromatography B*. – 2018. – V. 1083. – p. 124-136.
62. Carlucci, F. Development of a CE method for the determination of mycophenolic acid in human plasma: a comparison with HPLC / F. Carlucci, M. Anzini, M. Rovini [et al.] // *Electrophoresis*. – 2007. – V. 28, №21. – p. 3908-3914.
63. Chik, Z. A Bioequivalence Comparison of Two Captopril Formulations (25mg Tablets): An Open-Label, Randomized, Two-Treatment, Two-Way Crossover Study in Healthy Volunteers / Z. Chik, N.M. Deril, E.M.H. Didi [et al.] // *Bioequivalence & Bioavailability*. – 2014. – V.6, №3. – p. 80-85.
64. Challener, C.A. Ligand-Binding Assays and the Determination of Biosimilarity [Электронный ресурс] / C.A. Challener // *BioPharm International*. – 2015. – V. 28, № 1. – Режим доступа: <http://www.biopharminternational.com/ligand-binding-assays-and-determination-biosimilarity>.
65. Chen, B. Determination of mycophenolic acid (MPA) and its acyl and phenol glucuronide metabolites simultaneously in human plasma by a simplified HPLC method / B. Chen, W. Zhang, Z. Yu [et al.] // *Analytical Letters*. – 2007. – V. 40, №13. – p. 2465–2475.
66. Cuny, G.D. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors: a patent and scientific literature review (2002-2016) / G.D. Cuny, C. Suebsuwong, S.S. Ray // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2017. – V. 27, №6. – p. 677-690.
67. Daurel-Receveur, M. Fully automated analytical method for mycophenolic acid quantification in human plasma using on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection / M. Daurel-Receveur, K. Titier, S. Picard [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring*. – 2006. – V. 28, №4. – p. 505–511.
68. David-Neto, E. Development of an Abbreviated Mycophenolic Acid Area-Under-The-Time Concentration Curve for Renal Transplant Patients under Enteric-Coated Mycophenolate Sodium: A Comparison with Critical Analysis of Available Equations / E. David-Neto, A.H. Triboni, F. Ramos [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring*. – 2018. – V.40, №4 – p. 411-416.
69. Declaration of Helsinki of the AMM-Ethical Principles for Medical Research in humans / World Medical Assembly, 64th General Assembly. – 2013. – Режим доступа: [wma.net/en/30publications/10policies/b3/](http://wma.net/en/30publications/10policies/b3/).

70. Delavenne X. UPLC–MS/MS method for quantification of mycophenolic acid and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic study / X. Delavenne, L. Juthier, B. Pons [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2011. –V. 412, № 1-2. –p. 59-65.
71. Dell, D. Labile Metabolites / D. Dell // *Chromatographia Supplement*. - 2004. - №59. - p. 139-148.
72. Ebert, K. Serum and Saliva Concentrations of Venlafaxine, O-Desmethylvenlafaxine, Quetiapine, and Citalopram in Psychiatric Patients / K. Ebert, E. Maurice, R. Lukacin [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring*. – 2018. – V. 40, № 3. – p. 351-355.
73. Ebner, T. Disposition and Chemical stability of Telmisartan 1-O-acylglucuronide / T. Ebner, G. Heinzl, A. Prox [et al.]// *Drug Metabolism and Disposition*. - 1999. – V. 27, № 10. - p. 1143-1149.
74. Elbarty, F.A. Liquid chromatographic determination of mycophenolic acid and its metabolites in human kidney transplant plasma: Pharmacokinetic application / F.A. Elbarty, A.S. Shoker // *Journal of Chromatography B*. – 2007. –V. 859, №2. – p. 276-281.
75. Elbarty, F.A. Simple high performance liquid chromatographic assay for mycophenolic acid in renal transplant patients / F.A. Elbarty, A.S. Shoker // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2007. - V. 43, №2. - p. 788–792.
76. Elzanfaly, E.S. A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Method for Determination of Captopril in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study / E.S. Elzanfaly, H.A. Merey // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2017. – V. 7, №2.- p. 8-15.
77. Elliott, S. Investigative implications of the Instability and Metabolism of Mebeverine / S. Elliott, V. Burgess // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2006. – V. 30, №2. - p. 91-97.
78. Ewles, M. Bioanalytical approaches to Analyzing Therapeutic Peptides and Proteins by LC-MS/MS / M. Ewles, M. Pelzer // *Bioanalysis*. – 2011. – V. 3, №12. – p. 1379-1382.
79. Figurski, M.J. High-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy method for simultaneous quantification of total or free fraction of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites / M.J. Figurski, M. Korecka, L. Fields [et al. ] // *Therapeutic drug monitoring*.- 2009. - V. 31, №6. - p. 717–726.
80. Fiege, B. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration / B. Fiege, D. Ballhausen, L. Kierat [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. - 2004. - V. 81, №1. - p. 45–51.

81. Fung, E.N. Effective screening approach to select esterase inhibitors used for stabilizing ester-containing prodrugs analyzed by LC–MS/MS / E.N. Fung, N. Zheng, M.E. Arnold [et al.] // *Bioanalysis*. - 2010. – V.2, № 4. - p. 733–743.
82. Fura, A. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis/ A. Fura, T.W. Harper, H.Zhang [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.- 2003. - V.32, №3. - p. 513-522.
83. Gaillard, J. Successful therapy with mycophenolic acid in a membranous glomerulonephritis due to Kimura disease/ J. Gaillard, S. Rotman, C. Girardet [et al.] // *Clinical Nephrology*. – 2017. – V.88, №10.- p.221-225.
84. Gao, S. Rapid and sensitive method for simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs in human plasma by HPLC-MS/MS: Application to therapeutic drug monitoring/ S. Gao, Z.Wang, X. Xie [et al.] // *Tuberculosis*. – 2018. – V. 109. – p. 28 -34.
85. 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. - 2013. - Режим доступа: [fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf](http://fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf).
86. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System / U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research. - 2015. - Режим доступа: [fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf](http://fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf).
87. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use. - 2010. – Режим доступа: [ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
88. Guidance on the investigation of bioequivalence / European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use. - 2010. - Режим доступа: [ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf).
89. Guo, L. Simultaneous determination of ezetimibe and its glucuronide metabolite in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography- tandem mass-spectrometry /

- L. Guo, M.-m. Wang, M. He [et al.] // *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* – 2015. – V. 986-987. –p. 108-114.
90. Gumustas, M. Validated Stability-Indicating HPLC and UPLC Assay Methods for the Determination of Entacapone in Pharmaceutical Dosage Forms / M. Gumustas, B. Uslu, S.A. Ozkan [et al.] // *Chromatographia.* – 2014. - V. 77, №23–24. – p. 1721–1726.
91. He, G. Determination of the sulfate and glucuronide conjugates of levornidazole in human plasma and urine, and levornidazole and its five metabolites in human feces by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / G. He, B. Guo, J. Zhang [et al.] // *Journal of chromatography B.* – 2018. – V. 1081–1082. – p. 87-100.
92. Heinig K. Determination of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide in human plasma, ultrafiltrate, blood, DBS and dried plasma spots / K. Heinig, F. Bucheli, R. Hartenbach // *Bioanalysis.* – 2010. – V. 2, №8. –p. 1423-1435.
93. Hilhorst, M. Stabilization of clinical samples collected for quantitative bioanalysis – a reflection from the European Bioanalysis Forum / M. Hilhorst, P. van Amsterdam, K. Heinig [et al.] // *Bioanalysis.* - 2015. – V.7, №3. - p. 333-343.
94. Hosotsubo, H. Rapid and simple determination of mycophenolic acid in human plasma by ion-pair RP-LC with fluorescence detection / H. Hosotsubo, S. Takahara, Y. Kokado [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2001. - V.24, №4. - p. 555–560.
95. Howells, D.W. Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: prevention of autoxidation during storage and analysis / D.W. Howells, K. Hyland. // *Clinica Chimica Acta.* - 1987. - V.167, №1. - p. 23-30.
96. Hull, C.K. Quantification of rosuvastatin in human plasma by automated solid-phase extraction using tandem mass spectrometric detection / C.K. Hull, A.D. Penman, C.K. Smith [et al.] // *Journal of Chromatography B.* - 2002. - V. 772, №2. - p. 219–228.
97. Hypertensive Disorders in Pregnancy (HDP). Executive summary: Guideline of New York State Department of Health. – New York, 2013. – 16 p.
98. Jamali, B. Investigation of racemisation of the enantiomers of glitazone drug compounds at different pH using chiral HPLC and chiral CE / B. Jamali, I. Bjørnsdottir, O. Nordfang [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* - 2008. - V. 46, №1. - P. 82–87.

99. Jemal, M. LC/MS/MS Determination of Omapatrilat, a Sulfhydryl-Containing Vasopeptidase Inhibitor, and Its Sulfhydryl- and Thioether-Containing Metabolites in Human Plasma / M. Jemal, S. Khan, D.S. Teitz [et al.] // *Analytical Chemistry*. – V. 73, № 22. - 2001. - p. 5450-5456.
100. Jemal, M. Direct-injection LC–MS–MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma / M. Jemal, Z. Ouyang, M.L. Powell. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2000. - V.23, № 2-3. - p. 323–340.
101. Jemal, M. Quantitation of the Acid and Lactone Forms of Atorvastatin and its Biotransformation Products in Human Serum by High-performance Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry / M. Jemal, Z. Ouyang, B.C. Chen [et al.] // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. - 1999. - V.13, №11. - p.1003–1015.
102. Johnston, A. Bioequivalence of Enteric-Coated Mycophenolate Sodium and Mycophenolate Mofetil: A Meta-Analysis of Three Studies in Stable Renal Transplant Recipients / A. Johnston, X. He, D.W. Holt // *Clinical Transplantation*. – 2006. – V.82, № 11. – p. 1413-1418.
103. Karimi, M. Modified high performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid / M. Karimi, J.L. Carl, S. Loftin // *Journal of Chromatography B*. -2006. - V.836, № 1–2.- P. 120–123.
104. Katteboina, M.Y. LC-MS/MS Method Development and Validation of Montelukast in human plasma and its clinical application / M.Y. Katteboina, N.R. Pilli, S.R. Salta // *American Journal of Pharmaceutical Research*. - 2015. – V.5, № 3. - p. 646-657.
105. Khatri, C.A. Development and Validation of Bioanalytical Method for Simultaneous Quantification of Veratric Acid, Mebeverine Acid and Desmethyl Mebeverine Acid in Human Plasma by Using LC-MS/MS / C.A. Khatri, Ch.V. Phanikumar, K. Jayaveera [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2012. – V.6, № 4.- p. 11-18.
106. Khokhlov, A.L. Accurate Method of HPLC-Ms/Ms Determination of Mycophenolic Acid in Human Plasma / A.L. Khokhlov, I.I. Yaichkov, L.N. Shitov [et al.] // *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. – 2016. – V.9, №1. – p. 306-311.
107. Khokhlov, A.L. Methodical approaches to bioassay of phenolic hydroxylenes contain substances / A.L. Khokhlov, I.I. Yaichkov, Yu.A. Dzhurko [et al.] // *Medical news of north caucasus*. -2017. -V. 12, № 3. - p. 294-299.



108. Khokhlov, A.L. Methodical approaches to bioassay of substances containing unstable functional groups / A.L. Khokhlov, I.I. Yaichkov, Yu.A. Dzhurko [et al.] // *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology*. – 2018. – V.4, №1. – Режим доступа: <http://rrpharmacology.ru/journal/annotation/1338/>.
109. Khokhlov, A.L. The Pharmacokinetic Properties and Bioequivalence of Methyldopa Formulations: Results of an Open-label, Randomized, Two-period, Crossover, Single-dose Study / A.L. Khokhlov, L.N. Shitov, M. Ryska // *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. – 2016. – V.8, № 4. – p. 185-190.
110. Khokhlov, A.L. The Rapid and Sensitive Hplc-Ms/Ms-Method of Determination of Mebeverine Metabolites in Human Plasma / Khokhlov A.L., Dzhurko Y.A., Yaichkov I.I. [et al.] // *Mathews Journal of Pharmaceutical Science*. – 2017. –V.2, №1. - Режим доступа: [mathewsoopenaccess.com/PDF/pharmaceutical-science/M\\_J\\_Pharm\\_2\\_1\\_010.pdf](http://mathewsoopenaccess.com/PDF/pharmaceutical-science/M_J_Pharm_2_1_010.pdf).
111. Kiang, T.K.L. Population Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid: An Update / T.K.L. Kiang, M.H.H. Ensom // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2018. – V.57, №5.- p. 547-558.
112. Kim, Y. Quantitative analysis of acetylsalicylic acid in human blood using volumetric absorptive microsampling / Y. Kim, J.-Y. Jeon, S.-H. Han [et al.] // *Translational and Clinical Pharmacology*. – 2018. – V. 26, № 1. – p. 32-38.
113. Kongkiatpaiboon, S. Development and validation of stability indicating HPLC method for determination of adrenaline tartrate / S. Kongkiatpaiboon, N.Duangdee, S. Chewchinda [et al.] // *Journal of King Saud University – Science*. – 2017. – Режим доступа: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364717303142](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364717303142).
114. Kristinsson, J. The Metabolism of Mebeverine in Man: Identification of Urinary Metabolites by Gas Chromatography/Mass Spectrometry / J. Kristinsson, I. Snorrabttir, M. Johannsson // *Pharmacology & Toxicology*. – 1994. – V.14. - p. 174-180.
115. Kuhn, J. Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry assay / J. Kuhn, C. Prante, K. Kleesiek [et al.] // *Clinical Biochemistry*. - 2009. –V.42, №1-2. - p. 83–90.
116. Kuhn, J. Sample cleanup-free determination of mycophenolic acid and its glucuronide in serum and plasma using the novel technology of ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry / J. Kuhn, C. Götting, K. Kleesiek // *Talanta*. – 2010. –V. 80, №5. - p. 1894-1898.

117. Kuypers, D.R. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation/ D.R. Kuypers, Y.L. Le Meur, M. Cantarovich [et al.] // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. - 2010. – V.5, №2. – p. 341–358.
118. Li, W. Handbook of LC-MS Bioanalysis / W. Li, J. Zhang, F.L.S. Tse . - New Jersey: John Wiley and Sons, 2013. - 675 p.
119. Liberal, R. Expert clinical management of autoimmune hepatitis in the real world / R. Liberal, Y. S. de Boer , R. J. Andrade // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 2016. – V. 45, №5. – p. 723-732.
120. Lindegardh, N. Importance of Collection Tube during Clinical Studies of Oseltamivir / N. Lindegardh, G.R. Davies, T.T. Hien [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2007. – V. 51, №5. - P. 1835-1836.
121. Liu, Q. Effect of long-term coadministration of compound glycyrrhizin tablets on the pharmacokinetics of mycophenolic acid in rats / Q. Liu, Z. Jiao, M. Zhong [et al.] // *Xenobiotica*. – 2017. V 46, №7– p. 627-633.
122. Luc Bouchard, M.Sc. Importance of End-to-End Robustness when dealing with Glucuronide Metabolites / M.Sc. Luc Bouchard // *European bioanalysis forum: materials of 7th Open Symposium*. – 2014. – Режим доступа: [bcn201411.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2016/03/s39-Luc\\_Bouchard.pdf](http://bcn201411.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2016/03/s39-Luc_Bouchard.pdf).
123. Maddela, R. A novel and Rapid LC–MS/MS assay for the Determination of Mycophenolate and Mycophenolic Acid in Human Plasma / R. Maddela, N. Rao Pilli, S. Maddela [et al.] // *Journal of Young Pharmacists*. – 2017. – V.9, №1. – p. 107-114.
124. Magee, L.A. Diagnosis, Evaluation, and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy: Executive Summary: SOGC Clinical Practice Guideline / L.A. Magee, A. Pels, M. Helewa [et al.]. - *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2014. – V. 36, № 5. – p. 416-438.
125. Mendes, G.D. Cyclosporine bioequivalence study: quantification using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and radioimmunoassay (RIA) / G.D. Mendes, C.H. de Oliveira, M. Sucupira [et al.] // *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*.- 2004.-V.42, №2. – p. 125-132.
126. Mendonza, A.E. Analysis of mycophenolic acid in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry / A.E. Mendonza, R.Y. Gohh, F. Akhlaghi // *Therapeutic drug monitoring*.- 2006. -V. 28, №3. - p. 402–406.

127. Methyldopa. Chemical Product Property // Chemical book. - 2017. – Режим доступа: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB4277127.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4277127.htm).
128. Mino, Y. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronides in human plasma using isocratic ion pair high-performance liquid chromatography / Y. Mino, T. Naito, T. Matsushita [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2008. - V. 46, №3. - p. 603–608.
129. Mohamed, S. Simple and rapid validated HPLC-fluorescence determination of perampanel in the plasma of patients with epilepsy / S. Mohamed, C. Candela, R. Riva [et al.] // Practical Laboratory Medicine. – 2017. - № 10. – p. 15-20.
130. Monlar, S. Crystalline mycophenolate sodium: пат. PCT/US2005/025816 США / S. Monlar, C. Szabo, T. Tamas [et al.]; заявитель и патентообладатель: Teva Gyogyszergyar Zartkoruen Mukodo Reszvenytarsasag. - № WO 2006012385 A2; заявл. 20.07.2005, опубл. 22.07.2006. – Режим доступа: [encrypted.google.com/patents/WO2006012385A2?cl=en&hl=ru](http://encrypted.google.com/patents/WO2006012385A2?cl=en&hl=ru).
131. Moskaleva, N.E. HPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of desmethylmebeverine acid, mebeverine acid and mebeverine alcohol in human plasma along with its application to a pharmacokinetics study / N.E. Moskaleva, P.A. Baranov, N.V. Mesonzhnik [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2017. – V.138. - P. 118–125.
132. Morales-Roque J. Theoretical and experimental interpretations of phenol oxidation by the hydroxyl radical / J. Morales-Roque, M. Carrillo-Cordenas, N. Jayanthi [et al.] // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. –2009.-V. 910, №1-3. –p. 74–79.
133. Mulvana, D. Quantitative determination of pravastatin and its biotransformation products in human serum by turbo ion spray LC/MS/MS / D. Mulvana, M. Jemal, S. C. Pulver // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2000. – V. 23, №5. - p. 851–866.
134. Nielsen, S.E. Simultaneous determination of hydroxycinnamates and catechins in human urine samples by column switching liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry/ S.E. Nielsen, B. Sandstrom // Journal of Chromatography B.-2003. – V.787, №2.- P. 369–379.
135. Nigori, B. Simultaneous extraction of acetylsalicylic acid and Salicylic acid from human plasma and simultaneous estimation by liquid chromatography and atmospheric pressure

- chemical ionization / tandem massspectrometry detection / B. Nigori, V. Kandikere, K.Mudigonda [et al.] // *Arzneimittelforschung*. - 2011. – V.61, №5. – p. 301-311.
136. Ohyama, K. A simple and rapid CZE method for the analysis of mycophenolic acid and its phenol glucuronide metabolite in human serum / K. Ohyama, N. Kinoshita, N. Kishikawa [et al.] // *Electrophoresis*. – 2008. – V. 29, №17. - p. 3658-3664.
137. Ohyama, K. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human serum by capillary zone electrophoresis / K. Ohyama, N. Kishikawa, H. Nakagawa [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2008. -V. 47, №1. - p. 201–206.
138. Oliveira, C.H. Quantification of methyldopa in human plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Application to a bioequivalence study / C.H. Oliveira, R.E. Barrientos-Astigarraga, M. Sucupira [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2002. –V. 768, № 2. – P. 341-348.
139. Paal, M. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using anisotope-dilution HPLC–MS/MS method / M. Paal, M. Zoller, C. Schuster [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2018. – V. 152. –p. 102-110.
140. Parant, F. The Roche Total Mycophenolic Acid assay: An application protocol for the ABX Pentra 400 analyzer and comparison with LC–MS in children with idiopathic nephrotic syndrome / F. Parant, B. Ranchin, M.-C. Gagnieu // *Practical Laboratory Medicine*. – 2017. - №7 . – p. 19–26.
141. Partani, P. Development and Validation of an LC–MS-MS Method for Determination of Simvastatin and Simvastatin Acid in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study/ P. Partani, S. M. Verma, T. Monif // *Journal of Chromatographic Science*. – 2016. – V. 54, №8. – p. 1385-1396.
142. Partani, P. Simultaneous quantitation of atorvastatin and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography/(-) electrospray tandem mass spectrometry / P. Partani, S.M. Verma, S. Gurule [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2014. - V. 4, №1. – p. 26 - 36.
143. Patel, C.G. High-performance liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human plasma / C.G. Patel, F. Akhlaghi // *Therapeutic Drug Monitoring* – 2006. - V. 28, №1. - p. 116–122.

144. Patel, D.S. Sensitive and Selective Determination of Diflunisal in Human Plasma by LC-MS / Patel D.S., Sharma N., Patel M.C. [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2013. – V. 51, №9. – p. 872–882.
145. Patel, S. Single-dose, two-way crossover, bioequivalence study of mycophenolate mofetil 500 mg tablet under fasting conditions in healthy male subjects / S. Patel, V. Chauhan, J. Mandal [et al.] // *Clinical Therapeutics*. – 2011. – V. 33, №3. – p. 378-390.
146. Pham-Huy, C. Separation of oxazepam, lorazepam, and temazepam enantiomers by HPLS on a derivatized cyclodextrin-bonded phase: application to the determination of oxazepam in plasma / C. Pham-Huy, G. Villain-Pautet, H. Hua // *Biochemical and biophysical methods*. – 2002. – V. 54, №1-3. – p. 287-299.
147. Rao, K. V. A Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Bazedoxifene Acetate and its Related Substances in Active Pharmaceutical Ingredient / K. V. Rao, K. P.Reddy, K.S. Kumari [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2013 – V.51, №3. – p.215-221.
148. Rebollo, N. Modification of the EMIT immunoassay for the measurement of unbound mycophenolic acid in plasma / N. Rebollo, M.V. Calvo, A. Martin-Saurez [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2011. – V. 44, №2-3. – p. 260-263.
149. Rissling, O. Simultaneous determination of mycophenolate and its metabolite mycophenolate-7-o-glucuronide with an isocratic HPLC-UV-based method in human plasma and stability evaluation/ O. Rissling, S. Bauer, M. Shipkova [et al.] // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2016. – V.76, №8. – p. 612-619.
150. Riviere, J.E. *Comparative Pharmacokinetics Principles, Techniques, and Applications: монография* / J.E. Riviere. – Iowa: John Wiley and Sons, 2011. – 675 p.
151. Róna, K. Comparative Bioavailability of Alpha-Methyldopa normal and film tablet formulations after single oral administration in healthy volunteers/ K. Róna, K. Ary, G. Renczes [et al.] // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2001. – V. 26, № 1-2. – P. 25-30.
152. Ryska, M. How to deal with the “matrix effect” as an unavoidable phenomenon / M. Ryska // *European Journal of Mass Spectrometry*. – 2015. – №21, №3. – p. 423-432.
153. Sengupta, P. A high throughput LC-MS/MS method for simultaneous quantitation of pioglitazone and telmisartan in rat plasma; development, validation and pharmacokinetic ap-

plication / P. Sengupta, B. Chatterjee, U.K. Mandala [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2017. – V.7, №6. – p. 381-387.

154. Shah, I. Determination of diclofenac concentrations in human plasma using a sensitive gas chromatography mass spectrometry method / I. Shah, J. Barker, D.P. Naughton [et al.] // *Chemistry Central Journal*. – 2016. – V.10. – p. 1-10.

155. Shen, J. Quantification of total and free mycophenolic acid in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection / J. Shen, Z. Jiao, Y. Yu [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2007. – V. 817, №2. – p. 207-213.

156. Shihabi, Z.K. Enhanced detection in capillary electrophoresis: Example determination of serum mycophenolic acid / Z.K. Shihabi // *Electrophoresis* – 2009. - V. 30, №9. - p. 1516–1521.

157. Shipkova, M. Clinical utility of therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in transplantation medicine: Where are we? / M. Shipkova // *The Journal of Laboratory Medicine*. – 2009. –V. 33, №2. –p. 88-98.

158. Silva Filho, A.P. Evaluation of tolerability of enteric-coated mycophenolate sodium versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplantation / A.P. Silva Filho, R.C. Manfro, F.L. Carvalho Contieri [et. al.] // *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. – 2015. -V.37, № 3. – p. 291-296.

159. Sirok, D. Robust and sensitive LC/MS-MS method for simultaneous detection of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma / D. Sirok, M. Patfalusi, G. Szelezcky [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2018. – V. 136. – p. 200 – 208.

160. Stockis A. Identification of Mebeverine Acid as the Main Circulating Metabolite of Mebeverine in Man / A. Stockis, P.J.M. Guelen, D.de Vos // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2002. – V. 29, №1-2. – p. 335-340.

161. Suchocka, Z. RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum / Z. Suchocka, J. Swatowska, J. Pachecka [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2006. - V. 42, №1. - p. 113–119.

162. TarikaPriya, A. Formulation and evaluation of sustained release matrix tablets of mebeverine hydrochloride using natural and synthetic polymers / A TarikaPriya, M.S. Neeharika, C.K. Sekhar // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. - 2014. - V. 3, № 9. – p. 1044-1056.

163. The SOMANZ Guideline for the Management of Hypertensive Disorders of Pregnancy: Guideline of Society of Obstetric Medicine of Australia and New Zealand / S.A. Lowe, L. Bowyer, K. Lust [et al.]. -2014. - Режим доступа: [somanz.org/documents/HTPregnancyGuidelineJuly2014.pdf](http://somanz.org/documents/HTPregnancyGuidelineJuly2014.pdf).
164. Tomšíková, H. Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability / H. Tomšíková, Tomšík P., Solich P. [et al.] // *Bioanalysis*. - 2013. – V.5, №18 - p. 2307–2326.
165. Upadhyay, V. Determination of mycophenolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry / V. Upadhyay, V. Trivedi, G. Shah [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2014. – V. 4, №3. – p. 205-216
166. Valizadeh, H. Single dose bioequivalence study of a-methyldopa tablet formulations using a modified HPLC method / H. Valizadeh, M. Nemati, S.Hallaj-Nezhadi [et al.] // *Arzneimittelforschung*. – 2010. - V.60, №10. - P. 607-611.
167. Van de Merbel, N.C. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol in human plasma / N.C. Van de Merbel, K.J. Bronsema, M.W. van Hout [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2011. - V. 55, №5. - P. 1089 - 1095.
168. Van de Merbel, N.C. Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC-MS/MS: the importance of sample preparation / N.C. Van de Merbel, G. Hendriks, R. Imbos [et al.] // *Bioanalysis*. - 2011. – V. 3, №17. - P. 1949 – 1961.
169. Van der Nagel, B.C.H. High-throughput quantification of 8 antihypertensive drugs and active metabolites in human plasma using UPLC–MS/MS / B.C.H. van der Nagel, J. Versmissen, S. Bahmany [et al.] // *Journal of chromatography B*. – 2018. – V. 1060. – p. 367 -373.
170. Van Gelder, T. Clinica Utility of a New Enzymatic Assay for Determination of Mycophenolic Acid in Comparison With an Optimized LC–MS/MS Method / T. van Gelder, I. Domke, J. Engelmayer [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring*. - 2009. – V. 31, № 2. – p. 218-223.
171. Veeragoni, A.K. Bioanalytical Validated LC-MS Method for Determination of Naproxen in Human Plasma / A.K. Veeragoni, V.M. Sindgi, S.R. Satla // *International Journal for Modern Trends in Science and Technology*. – 2016. – V.2, №9. – p. 96-99.

172. Vlase, L. Determination of methyldopa in human plasma by LC/MS-MS for therapeutic drug monitoring / L. Vlase, D.Mihu, D.-S. Popa [et al.] // *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia*. - 2013. – V. 58, № 1. – P. 31-41.
173. Wang, C.J. Novel inhibition of cis/trans retinoic acid interconversion in biological fluids – an accurate method for determination trans and 13-cis retinoic acid in biological fluids / C.J. Wang, L.H. Pao, C.H. Hsiong [et al.] // *Journal of Chromatography B*. - 2003. - V. 796, №2.- P. 283-291.
174. Wang, L. A novel freeze-dried storage and preparation method for the determination of mycophenolic acid in plasma by high-performance liquid / L. Wang, W. Qiang, Y. Li // *Biomedical Chromatography*. – 2017. – V. 31, №9. – p. 3–27.
175. Warnken, T. Comparison of three different methods for the quantification of equine insulin / T. Warnken, K. Huber, K. Feige // *BMC Veterinary Research*. – 2016. – V. 12, №1. – Режим доступа:[researchgate.net/publication/307978817\\_Comparison\\_of\\_three\\_different\\_methods\\_for\\_the\\_quantification\\_of\\_equine\\_insulin](https://researchgate.net/publication/307978817_Comparison_of_three_different_methods_for_the_quantification_of_equine_insulin).
176. Wickremsinhe, E.R. Stereoselective Metabolism of Prasugrel in Humans Using a Novel Chiral Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method / E.R. Wickremsinhe, Y. Tian, K.J. Ruterbories [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. - 2007. – V.35, №6. - p. 917-921.
177. Wiesen, M.H.J. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva collection device / M.H.J. Wiesen, F. Farowski, M. Feldkötter [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – V. 1241. – p. 52-59.
178. Willis, C. Quantification of free mycophenolic acid by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry / C. Willis, P.J. Taylor, P. Salm [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2000. - V. 748, №1. - p. 151–156.
179. Winsemius, A. A pharmacokinetic comparison of the modified release capsule and a plain tablet formulation of mebeverine / A. Winsemius , I.M. Meuwesen , C. Boon [et al.] // *International Journal of Clinical Practice*. – 2002. – V 56, №9. – p. 659-662.
180. Ye, X. Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine / X. Ye, A.M. Bishop, J.A. Reidy [et al.] // *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. – 2007. – V.17, №6. – p. 567-572.



181. Yoon, S. Comparable pharmacokinetics and pharmacodynamics of two epoetin alfa formulations Eporon and Eprex following a single subcutaneous administration in healthy male volunteers / S. Yoon, S.-J.Rhee, S. J.Heo [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2017. - № 11. – p. 3127 – 3135.
182. Yoshimura, K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in Nagase analbuminemic rats: Evaluation of protein binding effects using the modeling and simulation approach / K. Yoshimura, I. Yano, M. Kawanishi [et al.] // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. –2015. - V. 30, №6. –p. 441-448.
183. Yu, Z.-C. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in Chinese adult renal transplant recipients / Z.-C. Yu, P.-J. Zhou, X.-H. Wang [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2017. – V.38, №11. – p. 1566-1579.
184. Zeng, J. Simultaneous determination of a selective adenosine 2A agonist, BMS-068645, and its acid metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry—Evaluation of the esterase inhibitor, diisopropyl fluorophosphate, in the stabilization of a labile ester-containing drug / J. Zeng, D. Onthank, P. Crane [et al.] // *Journal of Chromatography B*. - 2007. - V.852, №1-2. - P. 77–84.
185. Zhang, J. Nonlinear relationship between enteric-coated mycophenolate sodium dose and mycophenolic acid exposure in Han kidney transplantation recipients / J. Zhang, M. Jia, L. Zuo [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2017. –V. 7, №3. – p. 347–352.
186. Zhang, Q. Bioequivalence and pharmacokinetic comparison of two mycophenolate mofetil formulations in healthy Chinese male volunteers: An open-label, randomized-sequence, single-dose, two-way crossover study / Q. Zhang, Y. Tao, Y. Zhu [et al.] // *Clinical Therapeutics*. –2010. - V. 32, №1. –p. 171-178.
187. Zhang, Y. Recent Advances in Analytical Methods for the Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs / Y. Zhang, R. Zhang // *Drug Testing and Analysis*.- 2018. – V.10, №1. –p. 81-94.
188. Zhong, Y. Simultaneous determination of mycophenolic acid and valproic acid based on derivatization by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / Y. Zhong, Z. Jiao, Y. Yu // *Biomedical Chromatography*. – 2006. – V. 20, №4. – p. 319–326.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1

Пример расчётов при построении калибровочной зависимости при определении микрофеноловой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС

| Номинальная концентрация МФК, мкг/мл | S пика (ЕД*с) |                    | Соотношение S пиков «МФК / МФК-D <sub>3</sub> » | Рассчитанная концентрация | Относительная погрешность, % |
|--------------------------------------|---------------|--------------------|---|---------------------------|------------------------------|
|                                      | МФК           | МФК-D <sub>3</sub> |   |                           |                              |
| 0,5                                  | 55529         | 2189864            | 0,025   | 0,54                      | 8,69%                        |
| 1,0                                  | 106383        | 2138993            | 0,050   | 1,00                      | -0,33%                       |
| 4,0                                  | 493130        | 2219211            | 0,222   | 4,20                      | 5,08%                        |
| 8,0                                  | 916334        | 2287885            | 0,401   | 7,52                      | -6,02%                       |
| 12,0                                 | 1442693       | 2244294            | 0,643   | 12,02                     | 0,19%                        |
| 18,0                                 | 2062885       | 2114639            | 0,976   | 18,21                     | 1,16%                        |
| 24,0                                 | 2824812       | 2222106            | 1,271   | 23,71                     | -1,22%                       |
| 30,0                                 | 3504947       | 2152548            | 1,628   | 30,34                     | 1,15%                        |

Таблица 2

Пример расчётов при построении калибровочной зависимости при определении микрофеноловой кислоты методом ВЭЖХ-МС

| Номинальная концентрация МФК, мкг/мл | S пика (ЕД*с) | Рассчитанная концентрация | Относительная погрешность, % |
|--------------------------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|
| 0,05                                 | 8637,0        | 0,046                     | -8,68                        |
| 0,10                                 | 20738,0       | 0,110                     | 9,64                         |
| 0,25                                 | 51014,0       | 0,270                     | 7,88                         |
| 1,00                                 | 202881,8      | 1,073                     | 7,26                         |
| 2,50                                 | 531704,1      | 2,811                     | 12,44                        |
| 7,50                                 | 1520363,0     | 8,038                     | 7,17                         |
| 15,00                                | 2937102,0     | 15,528                    | 3,52                         |
| 22,50                                | 4446691,0     | 23,509                    | 4,48                         |
| 30,00                                | 5450600,0     | 28,816                    | -3,95                        |

Таблица 3

Пример расчётов при построении калибровочной зависимости при определении микрофеноловой кислоты методом ГХ-МС

| Номинальная концентрация МФК, мкг/мл | S пика (ЕД*с) | Рассчитанная концентрация | Относительная погрешность, % |
|--------------------------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|
| 0,05                                 | 51064,3       | 0,046                     | -8,76                        |
| 0,10                                 | 101403,4      | 0,091                     | -9,41                        |
| 0,25                                 | 246782,2      | 0,220                     | -11,81                       |
| 1,00                                 | 1105793,5     | 0,988                     | -1,21                        |
| 2,50                                 | 2497042,8     | 2,231                     | -10,77                       |
| 7,50                                 | 7770817,6     | 6,942                     | -7,43                        |
| 15,00                                | 16635121,3    | 14,862                    | -0,92                        |
| 22,50                                | 25240442,5    | 22,550                    | 0,22                         |
| 30,00                                | 33796947,8    | 30,194                    | 0,65                         |

Таблица 4

Пример расчётов при построении калибровочной зависимости при определении метилдопы методом ВЭЖХ-МС/МС

| Номинальная концентрация МД, мкг/мл | S пика (ЕД*с) |                   | Соотношение S пиков «МД / МД-D <sub>3</sub> » | Рассчитанная концентрация | Относительная погрешность, % |
|-------------------------------------|---------------|-------------------|---|---------------------------|------------------------------|
|                                     | МД            | МД-D <sub>3</sub> |   |                           |                              |
| 0,02                                | 357743        | 12671739          | 0,028232                                      | 0,022                     | 11,76%                       |
| 0,10                                | 1612492       | 11219487          | 0,143722                                      | 0,099                     | -0,60%                       |
| 0,25                                | 3808161       | 10955072          | 0,347616                                      | 0,235                     | -5,83%                       |
| 1,00                                | 14581198      | 10407455          | 1,401034                                      | 0,938                     | -6,18%                       |
| 1,50                                | 22357230      | 10630539          | 2,103113                                      | 1,407                     | -6,23%                       |
| 2,00                                | 30317628      | 9970237           | 3,040813                                      | 2,032                     | 1,61%                        |
| 2,50                                | 45193802      | 11431475          | 3,953453                                      | 2,641                     | 5,64%                        |
| 3,00                                | 45151914      | 10070349          | 4,483649                                      | 2,995                     | -0,17%                       |

Таблица 5

Пример расчётов при построении калибровочной зависимости при определении МК и ДМК методом ВЭЖХ-МС/МС

| Мебевериновая кислота                  |                    |                    |   |                           |                              |
|--|--------------------|--------------------|---|---------------------------|------------------------------|
| Номинальная концентрация МК, мкг/мл    | S пика (ЕД*с)      |                    | Соотношение S пиков «МК/МК-D <sub>5</sub> »     | Рассчитанная концентрация | Относительная погрешность, % |
|  | МК                 | МК-D <sub>5</sub>  |   |                           |                              |
| 10                                     | 146541             | 7026700            | 0,0209  | 10,3                      | 2,55%                        |
| 50                                     | 689533             | 7524133            | 0,0916  | 47,5                      | -5,03%                       |
| 200                                    | 2742495            | 6952407            | 0,3945  | 206,7                     | 3,37%                        |
| 500                                    | 7181233            | 7628773            | 0,9413  | 494,3                     | -1,13%                       |
| 750                                    | 9852891            | 6871044            | 1,4340  | 753,4                     | 0,46%                        |
| 1000                                   | 13323293           | 7049872            | 1,8899  | 993,2                     | -0,68%                       |
| 1500                                   | 20635138           | 7162033            | 2,8812  | 1514,5                    | 0,97%                        |
| 2000                                   | 27624133           | 7297443            | 3,7855  | 1990,1                    | -0,50%                       |
| Деметилированная мебевериновая кислота |                    |                    |   |                           |                              |
| Номинальная концентрация ДМК, мкг/мл   | Площадь хром. пика |                    | Соотношение S пиков «ДМК / ДМК-D <sub>5</sub> » | Рассчитанная концентрация | Относительная погрешность, % |
|  | ДМК                | ДМК-D <sub>5</sub> |   |                           |                              |
| 10                                     | 73718              | 3613921            | 0,0204  | 10,2                      | 2,46%                        |
| 50                                     | 334061             | 3541120            | 0,0943  | 52,5                      | 5,02%                        |
| 200                                    | 1067039            | 3146690            | 0,3391  | 192,4                     | -3,80%                       |
| 500                                    | 2904911            | 3415655            | 0,8505  | 484,7                     | -3,06%                       |
| 750                                    | 4457283            | 3443138            | 1,2945  | 738,5                     | -1,53%                       |
| 1000                                   | 5833697            | 3318189            | 1,7581  | 1003,5                    | 0,35%                        |
| 1500                                   | 8944877            | 3523743            | 2,5385  | 1449,5                    | -3,37%                       |
| 2000                                   | 11812960           | 3246128            | 3,6391  | 2078,6                    | 3,93%                        |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 1

## Оценка стабильности микофеноловой кислоты в плазме

| № измерения  | Исходные значения | Краткосрочная стабильность (24 ч. при комнатной температуре) | Долгосрочная стабильность (при температуре не выше - 20°C) |               | Стабильность при замораживании/размораживании (3 цикла) | Стабильность депротенината в автосемплере (24 ч.) |
|--|-------------------|--|--|---------------|---|---|
|  |                   |  | через 1 мес.   | через 4 мес.  |   |   |
| образцы КК нижнего уровня концентраций – 1,50 мкг/мл   |                   |  |  |               |   |   |
| 1  | 1,65              | 1,54   | 1,63   | 1,65          | 1,71  | 1,67  |
| 2  | 1,82              | 1,47   | 1,47   | 1,55          | 1,62  | 1,59  |
| 3  | 1,61              | 1,53   | 1,43   | 1,50          | 1,55  | 1,66  |
| 4  | 1,64              | 1,55   | 1,60   | 1,47          | 1,45  | 1,68  |
| 5  | 1,65              | 1,44   | 1,44   | 1,60          | 1,52  | 1,56  |
| 6  | 1,65              | 1,41   | 1,46   | 1,53          | 1,60  | 1,53  |
| Сред. знач.  | 1,67              | 1,49   | 1,51   | 1,55          | 1,58  | 1,62  |
| SD   | 0,08              | 0,06   | 0,09   | 0,07          | 0,09  | 0,07  |
| CV, %  | 4,62              | 4,04   | 5,72   | 4,23          | 5,47  | 4,04  |
| Конц., % от номинального уровня                        | <b>111,38</b>     | <b>99,18</b>   | <b>100,38</b>  | <b>103,24</b> | <b>105,10</b>   | <b>107,72</b>                                     |
| образцы КК верхнего уровня концентраций – 22,50 мкг/мл |                   |  |  |               |   |   |
| 1  | 25,52             | 23,18  | 20,90  | 23,14         | 23,49   | 25,19   |
| 2  | 23,01             | 21,02  | 21,35  | 22,29         | 21,64   | 22,84   |
| 3  | 24,96             | 22,23  | 21,54  | 22,85         | 24,15   | 24,15   |
| 4  | 23,26             | 23,59  | 21,15  | 21,72         | 23,65   | 25,63   |
| 5  | 24,49             | 22,83  | 22,23  | 23,53         | 23,63   | 24,81   |
| 6  | 24,50             | 21,42  | 20,79  | 22,62         | 23,22   | 23,27   |
| Сред. знач.  | 24,29             | 22,38  | 21,33  | 22,69         | 23,30   | 24,32   |
| SD   | 0,97              | 1,01   | 0,52   | 0,64          | 0,87  | 1,10  |
| CV, %  | 4,01              | 4,51   | 2,44   | 2,82          | 3,72  | 4,51  |
| Конц., % от номинального уровня                        | <b>107,96</b>     | <b>99,46</b>   | <b>94,79</b>   | <b>100,86</b> | <b>103,55</b>   | <b>108,07</b>                                     |

Таблица 2

## Результаты оценки стабильности метилдопы в плазме

| № п/п  | Исходные значения | Краткосрочная стабильность (через 24 ч. при комнатной температуре) | Стабильность при замораживании/размораживании (3 цикла) | Стабильность депротенината в автосемплере (48 ч.) |
|--|-------------------|--|---|---|
| образцы КК нижнего уровня концентраций - 0,06 мкг/мл |                   |  |   |   |
| 1  | 0,059             | 0,058  | 0,063   | 0,062   |
| 2  | 0,056             | 0,057  | 0,063   | 0,061   |
| 3  | 0,058             | 0,058  | 0,064   | 0,060   |
| 4  | 0,058             | 0,057  | 0,061   | 0,060   |
| 5  | 0,058             | 0,058  | 0,063   | 0,062   |
| 6  | 0,058             | 0,056  | 0,063   | 0,062   |
| Сред. знач.  | 0,058             | 0,057  | 0,063   | 0,061   |
| SD   | 0,001             | 0,001  | 0,001   | 0,001   |
| CV, %  | 1,63              | 1,04   | 1,47  | 1,21  |

|   |              |              |               |               |
|---|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Конц., % от номинального уровня.                      | <b>96,22</b> | <b>95,50</b> | <b>104,43</b> | <b>101,91</b> |
| образцы КК верхнего уровня концентраций - 2,40 мкг/мл |              |              |               |               |
| 1   | 2,311        | 2,101        | 2,419         | 2,440         |
| 2   | 2,305        | 2,047        | 2,612         | 2,427         |
| 3   | 2,341        | 2,176        | 2,577         | 2,443         |
| 4   | 2,357        | 2,185        | 2,622         | 2,433         |
| 5   | 2,357        | 2,202        | 2,613         | 2,419         |
| 6   | 2,328        | 2,190        | 2,557         | 2,423         |
| Сред. знач.   | 2,333        | 2,150        | 2,567         | 2,431         |
| SD  | 0,023        | 0,062        | 0,077         | 0,009         |
| CV, %   | 0,97         | 2,89         | 2,98          | 0,39          |
| Конц., % от номинального уровня                       | <b>97,22</b> | <b>89,58</b> | <b>106,95</b> | <b>101,28</b> |

Таблица 3

### Результаты оценки стабильности мебевериновой кислоты в плазме

| № измерения  | Исходные значения | Краткосрочная стабильность (через 24 ч. при комнатной температуре) | Долгосрочная стабильность (при температуре не выше -20°C) |               | Стабильность при замораживании/размораживании (3 цикла) | Стабильность депротенината в автосемплере (48 ч.) |
|--|-------------------|--|---|---------------|---|---|
|  |                   |  | 1 мес.  | 4 мес.        |   |   |
| образцы КК нижнего уровня концентраций - 30 нг/мл    |                   |  |   |               |   |   |
| 1  | 33,9              | 33,0   | 34,0  | 35,9          | 32,7  | 32,2  |
| 2  | 32,1              | 31,7   | 34,5  | 32,9          | 34,4  | 33,0  |
| 3  | 33,2              | 33,7   | 33,8  | 32,6          | 33,5  | 34,4  |
| 4  | 30,4              | 31,1   | 33,3  | 33,2          | 34,2  | 33,2  |
| 5  | 32,7              | 32,4   | 34,2  | 33,6          | 34,4  | 31,0  |
| 6  | 32,8              | 32,0   | 34,0  | 33,6          | 33,1  | 32,5  |
| Сред. знач.  | 32,5              | 32,3   | 34,0  | 33,6          | 33,7  | 32,7  |
| SD   | 1,196             | 0,933  | 0,4   | 1,2           | 0,7   | 1,132   |
| CV, %  | 3,68              | 2,89   | 1,13  | 3,54          | 2,09  | 3,46  |
| Конц., % от номинального уровня                      | <b>108,39</b>     | <b>107,72</b>  | <b>113,23</b>   | <b>112,13</b> | <b>112,34</b>   | <b>109,06</b>                                     |
| образцы КК верхнего уровня концентраций - 1600 нг/мл |                   |  |   |               |   |   |
| 1  | 1 500,0           | 1 540,5  | 1 708,9   | 1 661,9       | 1 912,4   | 1 449,1   |
| 2  | 1 633,8           | 1 613,2  | 1 621,2   | 1 460,6       | 1 951,4   | 1 695,8   |
| 3  | 1 512,0           | 1 615,7  | 1 648,2   | 1 677,3       | 1 964,6   | 1 492,3   |
| 4  | 1 714,6           | 1 523,9  | 1 703,2   | 1 694,2       | 1 603,1   | 1 566,9   |
| 5  | 1 743,4           | 1 592,1  | 1 717,8   | 1 730,9       | 1 588,3   | 1 541,5   |
| 6  | 1 699,1           | 1 504,2  | 1 724,2   | 1 717,2       | 1 615,7   | 1 608,9   |
| Сред. знач.  | 1633,8            | 1564,9   | 1687,3  | 1657,0        | 1 772,6   | 1559,1  |
| SD   | 105,397           | 48,196   | 42,212  | 99,477        | 187,4   | 87,292  |
| CV, %  | 6,45              | 3,08   | 2,50  | 6,00          | 10,57   | 5,60  |
| Конц., % от номинального уровня                      | <b>102,11</b>     | <b>97,81</b>   | <b>105,45</b>   | <b>103,56</b> | <b>110,79</b>   | <b>97,44</b>                                      |

## Результаты оценки стабильности деметилированной мебевериновой кислоты в плазме

| № измерения  | Исходные значения | Краткосрочная стабильность (через 24 часа при комнатной температуре) | Долгосрочная стабильность (при температуре не выше -20°C) |               | Стабильность при замораживании/размораживании (3 цикла) | Стабильность депротениниzata в автоसेплере (48 ч.) |
|--|-------------------|--|---|---------------|---|--|
|  |                   |  | 1 мес.  | 4 мес.        |   |  |
| образцы КК нижнего уровня концентраций - 30 нг/мл    |                   |  |   |               |   |  |
| 1  | 30,5              | 34,6   | 35,8  | 33,5          | 35,3  | 31,8   |
| 2  | 33,0              | 32,7   | 34,6  | 35,0          | 30,1  | 32,0   |
| 3  | 32,9              | 34,4   | 32,0  | 31,9          | 32,0  | 31,8   |
| 4  | 31,5              | 31,3   | 33,9  | 33,3          | 34,0  | 30,3   |
| 5  | 32,0              | 33,1   | 33,5  | 35,1          | 35,5  | 28,5   |
| 6  | 34,3              | 34,3   | 33,7  | 35,7          | 32,9  | 31,8   |
| Сред. знач.  | 32,4              | 33,4   | 33,9  | 34,1          | 33,3  | 31,0   |
| SD   | 1,326             | 1,3  | 1,3   | 1,4           | 2,1   | 1,389  |
| CV, %  | 4,10              | 3,86   | 3,77  | 4,21          | 6,28  | 4,48   |
| Конц., % от номинального уровня                      | <b>107,89</b>     | <b>111,41</b>  | <b>113,07</b>   | <b>113,61</b> | <b>110,98</b>   | <b>103,44</b>                                      |
| образцы КК верхнего уровня концентраций - 1600 нг/мл |                   |  |   |               |   |  |
| 1  | 1 423,0           | 1 590,3  | 1 743,5   | 1 787,4       | 2 013,2   | 1 475,80   |
| 2  | 1 676,2           | 1 575,1  | 1 782,0   | 1 590,8       | 2 182,8   | 1 576,90   |
| 3  | 1 526,4           | 1 476,0  | 1 746,8   | 1 783,8       | 1 970,9   | 1 495,00   |
| 4  | 1 627,7           | 1 541,2  | 1 770,1   | 1 765,6       | 1 652,1   | 1 545,80   |
| 5  | 1 629,3           | 1 489,0  | 1 772,2   | 1 810,8       | 1 580,1   | 1 618,60   |
| 6  | 1 569,5           | 1 488,6  | 1 776,6   | 1 827,5       | 1 639,2   | 1 404,40   |
| Сред. знач.  | 1575,4            | 1 526,7  | 1 765,2   | 1 761,0       | 1 839,7   | 1519,4   |
| SD   | 91,063            | 49,1   | 16,1  | 86,1          | 248,1   | 76,896   |
| CV, %  | 5,78              | 3,22   | 0,91  | 4,89          | 13,49   | 5,06   |
| Конц., % от номинального уровня                      | <b>98,46</b>      | <b>95,42</b>   | <b>110,33</b>   | <b>110,06</b> | <b>114,98</b>   | <b>94,96</b>                                       |

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Влияние природы органического растворителя и pH среды на степень извлечения микофеноловой кислоты

| pH среды | Органический растворитель |          |           |       |               |          |           |       |               |         |           |       |
|----------|---------------------------|----------|-----------|-------|---------------|----------|-----------|-------|---------------|---------|-----------|-------|
|          | Хлористый метилен         |          |           |       | Этилацетат    |          |           |       | Н-Гексан      |         |           |       |
|          | S пика (ЕД*с)             |          |           | СИ, % | S пика (ЕД*с) |          |           | СИ, % | S пика (ЕД*с) |         |           | СИ, % |
|          | 1                         | 2        | Ср. знач. |       | 1             | 2        | Ср. знач. |       | 1             | 2       | Ср. знач. |       |
| 2,0      | 43061110                  | 44623244 | 43842177  | 89,24 | 25017861      | 21765565 | 23391713  | 47,61 | 2857857       | 2797951 | 2827904   | 5,76  |
| 3,0      | 42358239                  | 42634830 | 42496535  | 86,50 | 33422351      | 34781858 | 34102105  | 69,41 | 2761804       | 2767981 | 2764893   | 5,63  |
| 4,0      | 39023372                  | 39161447 | 39092410  | 79,57 | 32325470      | 32541235 | 32433353  | 66,02 | 2921571       | 2882633 | 2902102   | 5,91  |
| 5,0      | 40115816                  | 40521482 | 40318649  | 82,07 | 31534076      | 32360221 | 31947149  | 65,03 | 2061389       | 2028065 | 2044727   | 4,16  |
| 6,0      | 36217018                  | 36959811 | 36588415  | 74,47 | 30545277      | 30389451 | 30467364  | 62,02 | 157175        | 154850  | 156013    | 0,32  |
| 7,0      | 31426971                  | 32498602 | 31962787  | 65,06 | 28873169      | 30021162 | 29447166  | 59,94 | 24899         | 19418   | 22159     | 0,05  |
| 8,0      | 503151                    | 518337   | 510744    | 1,04  | 3364439       | 3402044  | 3383242   | 6,89  | 14635         | 11339   | 12987     | 0,03  |
| 9,0      | 127131                    | 101806   | 114469    | 0,23  | 808459        | 834597   | 821528    | 1,67  | 17028         | 15235   | 16132     | 0,03  |
| 10,0     | 29425                     | 30698    | 30062     | 0,06  | 533718        | 509385   | 521552    | 1,06  | 15708         | 17108   | 16408     | 0,03  |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Таблица 1

Индивидуальные концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев (мкг/мл) после однократного приёма **тестируемого** препарата **микофенолата натрия**

| № доб-<br>роволь-<br>ца | После-<br>дова-<br>тель-<br>ность | Время, часы |      |      |       |       |       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                         |                                   | 0           | 0,25 | 0,5  | 0,75  | 1     | 1,5   | 2     | 3    | 4    | 6    | 8    | 12   | 18   | 24   | 48   | 72   |
| 1                       | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 21,55 | 4,71  | 0,79 | 0,00 | 0,00 | 0,68 | 0,51 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2                       | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 2,58  | 29,31 | 0,00  | 3,50 | 1,53 | 0,58 | 1,04 | 0,75 | 0,59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 3                       | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 5,62  | 25,91 | 5,67  | 1,23 | 0,57 | 0,52 | 0,00 | 0,73 | 0,00 | 1,02 | 0,00 | 0,00 |
| 4                       | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,92  | 17,02 | 14,13 | 2,12 | 0,63 | 1,22 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 5                       | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 1,21  | 4,43  | 9,87  | 13,73 | 1,89 | 0,90 | 0,92 | 0,00 | 1,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 6                       | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,65  | 13,58 | 13,41 | 1,46 | 0,56 | 0,00 | 0,00 | 0,82 | 0,00 | 0,75 | 0,00 | 0,00 |
| 7                       | RT                                | 0,00        | 0,00 | 1,90 | 23,42 | 20,12 | 5,95  | 2,34  | 0,75 | 0,00 | 0,74 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 8                       | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,61  | 11,63 | 11,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,39 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 9                       | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 5,22  | 3,46 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 1,57  | 13,45 | 4,61  | 0,95 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 11                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 9,86 | 7,58 | 0,84 | 1,43 | 0,90 | 0,00 | 0,82 | 0,00 | 0,00 |
| 12                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 20,37 | 23,66 | 5,57  | 2,47  | 0,75 | 0,00 | 0,62 | 1,60 | 0,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 22,82 | 3,85 | 1,22 | 0,00 | 1,03 | 0,55 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 7,28  | 17,91 | 5,50  | 1,13 | 0,00 | 0,73 | 0,00 | 0,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 22,86 | 21,29 | 0,58  | 1,32 | 0,57 | 0,00 | 0,00 | 1,13 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 28,22 | 6,12  | 1,11 | 0,00 | 0,78 | 0,00 | 0,59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 8,74  | 24,68 | 16,20 | 5,10  | 1,60 | 0,81 | 0,74 | 0,00 | 1,11 | 0,66 | 0,51 | 0,00 | 0,00 |
| 18                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 3,43 | 12,41 | 14,31 | 5,04  | 1,94  | 0,81 | 0,00 | 0,70 | 0,52 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 19                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 12,20 | 1,76 | 0,55 | 1,01 | 0,00 | 0,57 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 20                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 21,72 | 23,35 | 3,10 | 1,25 | 0,86 | 1,07 | 0,00 | 0,52 | 0,51 | 0,00 | 0,00 |
| 21                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 1,76  | 13,02 | 9,02  | 1,56 | 0,53 | 0,00 | 0,00 | 0,72 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 22                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 2,56  | 9,06  | 6,40  | 3,36 | 0,93 | 0,56 | 0,53 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 23                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 6,29 | 6,37 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,61 | 0,00 | 0,00 |
| 24                      | RT                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 5,05  | 2,88  | 1,27 | 1,26 | 0,56 | 0,59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 25                      | TR                                | 0,00        | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 4,51  | 21,37 | 10,18 | 1,59 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 1,02 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |



| № доб-<br>роволь-<br>ца | После-<br>дова-<br>тель-<br>ность | Время, часы |             |               |               |               |              |              |               |               |               |               |              |               |               |             |             |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------|-------------|
|                         |                                   | 0           | 0,25        | 0,5           | 0,75          | 1             | 1,5          | 2            | 3             | 4             | 6             | 8             | 12           | 18            | 24            | 48          | 72          |
| 26                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 1,42          | 8,30          | 25,58        | 7,63         | 1,64          | 0,64          | 0,53          | 1,10          | 0,78         | 0,00          | 0,62          | 0,00        | 0,00        |
| 27                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 3,10          | 11,49        | 3,25         | 0,87          | 0,00          | 0,00          | 0,82          | 0,64         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 28                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 1,92          | 14,11         | 13,72        | 4,41         | 0,80          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 0,00          | 0,60          | 0,00        | 0,00        |
| 29                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 2,19         | 15,13         | 2,26          | 0,00          | 0,00          | 1,18         | 0,52          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 30                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 5,49         | 21,85        | 3,70          | 0,93          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 0,00          | 0,55          | 0,00        | 0,00        |
| 31                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 3,51          | 18,84        | 12,45        | 2,13          | 0,73          | 0,80          | 0,00          | 1,54         | 0,83          | 0,52          | 0,00        | 0,00        |
| 32                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 7,86          | 18,12        | 6,25         | 1,67          | 0,65          | 0,00          | 0,95          | 0,00         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 33                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 16,19         | 24,77        | 7,22         | 1,55          | 0,90          | 0,81          | 0,00          | 0,70         | 0,00          | 0,64          | 0,00        | 0,00        |
| 34                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 1,27          | 20,64        | 6,22         | 1,07          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,69         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 35                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 5,63         | 28,61        | 2,78          | 0,87          | 0,00          | 1,27          | 0,00         | 0,51          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 36                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 24,69        | 15,56        | 2,23          | 0,90          | 1,04          | 0,89          | 0,87         | 0,52          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 37                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 2,09          | 11,02        | 4,14         | 0,68          | 0,79          | 0,00          | 0,69          | 0,00         | 0,00          | 0,71          | 0,00        | 0,00        |
| 38                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 10,66        | 16,60        | 3,01          | 1,20          | 0,52          | 0,84          | 0,00         | 0,00          | 0,88          | 0,00        | 0,00        |
| 39                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 0,00         | 14,93         | 1,91          | 0,00          | 0,00          | 0,69         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 40                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 9,61          | 17,26         | 6,07         | 2,40         | 0,93          | 0,53          | 0,00          | 0,53          | 0,00         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 41                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 12,21        | 8,71         | 1,50          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 0,77          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 42                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,56          | 5,09          | 12,33        | 4,03         | 0,81          | 0,00          | 0,55          | 0,00          | 0,58         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 43                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 4,04         | 7,78          | 1,39          | 0,73          | 0,00          | 0,59         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 44                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 1,87          | 12,18        | 13,13        | 2,54          | 1,14          | 1,19          | 0,00          | 0,81         | 0,63          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 45                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 3,98          | 7,96         | 7,83         | 1,20          | 0,00          | 0,86          | 0,00          | 0,55         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 46                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 11,04        | 20,65        | 3,41          | 0,88          | 0,00          | 0,66          | 0,00         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 47                      | RT                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 7,11         | 6,48         | 1,03          | 0,56          | 0,00          | 0,58          | 0,00         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| 48                      | TR                                | 0,00        | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 0,00         | 8,52          | 1,09          | 0,00          | 0,00          | 0,00         | 0,00          | 0,00          | 0,00        | 0,00        |
| <b>Ср. знач.</b>        |                                   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,11</b>   | <b>1,66</b>   | <b>4,64</b>   | <b>11,92</b> | <b>8,07</b>  | <b>2,82</b>   | <b>0,92</b>   | <b>0,38</b>   | <b>0,37</b>   | <b>0,48</b>  | <b>0,12</b>   | <b>0,18</b>   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |
| <b>Медиана</b>          |                                   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>1,42</b>   | <b>11,56</b> | <b>6,17</b>  | <b>1,60</b>   | <b>0,69</b>   | <b>0,26</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,58</b>  | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |
| <b>Макс. знач.</b>      |                                   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |
| <b>Мин. знач.</b>       |                                   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>3,43</b>   | <b>23,42</b>  | <b>24,68</b>  | <b>29,31</b> | <b>28,61</b> | <b>15,13</b>  | <b>7,58</b>   | <b>1,22</b>   | <b>1,60</b>   | <b>1,54</b>  | <b>0,83</b>   | <b>1,02</b>   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |
| <b>SD</b>               |                                   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,56</b>   | <b>4,97</b>   | <b>7,11</b>   | <b>8,65</b>  | <b>6,93</b>  | <b>3,28</b>   | <b>1,39</b>   | <b>0,41</b>   | <b>0,48</b>   | <b>0,46</b>  | <b>0,25</b>   | <b>0,31</b>   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |
| <b>CV</b>               |                                   | -           | -           | <b>505,06</b> | <b>299,54</b> | <b>153,19</b> | <b>72,55</b> | <b>85,88</b> | <b>116,34</b> | <b>150,81</b> | <b>107,60</b> | <b>130,83</b> | <b>94,88</b> | <b>214,53</b> | <b>171,47</b> | -           | -           |
| <b>SE</b>               |                                   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,08</b>   | <b>0,72</b>   | <b>1,03</b>   | <b>1,25</b>  | <b>1,00</b>  | <b>0,47</b>   | <b>0,20</b>   | <b>0,06</b>   | <b>0,07</b>   | <b>0,07</b>  | <b>0,04</b>   | <b>0,05</b>   | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |

Таблица 2

Индивидуальные концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев (мкг/мл) после однократного приёма препарата «Майфортик»

| № доброво-<br>льца | Последова-<br>тельность | Время, часы |      |     |      |       |       |       |       |       |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------|-------------------------|-------------|------|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
|                    |                         | 0           | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1     | 1,5   | 2     | 3     | 4     | 6    | 8    | 12   | 18   | 24   | 48   | 72   |
| 1                  | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2                  | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 3,08  | 18,14 | 3,26  | 0,72 | 0,85 | 1,78 | 0,00 | 1,49 | 0,00 | 0,00 |
| 3                  | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 16,93 | 4,50  | 1,86  | 0,00 | 0,00 | 0,93 | 0,00 | 0,65 | 0,00 | 0,00 |
| 4                  | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 10,62 | 19,68 | 3,32  | 1,29  | 0,59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 5                  | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 6,34  | 10,32 | 1,11  | 0,55 | 0,00 | 0,74 | 0,00 | 0,55 | 0,00 | 0,00 |
| 6                  | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 14,23 | 3,61  | 0,62 | 0,00 | 0,74 | 0,00 | 0,81 | 0,00 | 0,00 |
| 7                  | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 2,30  | 8,81  | 1,23  | 0,00 | 0,00 | 0,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 8                  | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 10,17 | 0,69 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 9                  | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 11,51 | 1,12  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,53  | 6,73  | 4,25  | 1,44  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 11                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 11,03 | 6,13  | 1,35  | 0,61 | 0,72 | 0,82 | 0,55 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 12                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 3,64  | 10,51 | 2,48  | 0,56 | 1,29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 13,05 | 4,69  | 1,18  | 0,00 | 0,55 | 0,69 | 0,00 | 0,51 | 0,00 | 0,00 |
| 14                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 6,16  | 17,69 | 1,88  | 0,54  | 0,00 | 0,75 | 0,94 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 17,46 | 3,39  | 0,00 | 0,00 | 0,82 | 0,53 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 1,57  | 5,85  | 0,00 | 0,00 | 0,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 3,76  | 23,34 | 5,06  | 1,78  | 0,56 | 0,00 | 0,79 | 0,58 | 0,59 | 0,00 | 0,00 |
| 18                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 1,02  | 7,05  | 6,40  | 2,46  | 1,17  | 1,25 | 0,55 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 19                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 8,36  | 3,00  | 0,63  | 0,00 | 0,80 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 20                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 12,23 | 10,52 | 0,75 | 0,63 | 0,83 | 0,65 | 0,65 | 0,00 | 0,00 |
| 21                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,89  | 10,31 | 2,41  | 0,00 | 0,69 | 0,60 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 22                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,95  | 9,71  | 3,02  | 1,43  | 0,74 | 0,56 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 23                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 9,71  | 1,34 | 0,81 | 0,84 | 0,00 | 0,57 | 0,00 | 0,00 |
| 24                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 1,77  | 1,60  | 0,00  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 25                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 13,43 | 23,00 | 6,33  | 1,20  | 0,00  | 0,93 | 0,00 | 0,66 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 26                 | RT                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 18,17 | 4,77  | 0,94  | 0,89 | 0,58 | 1,01 | 0,00 | 0,90 | 0,68 | 0,00 |
| 27                 | TR                      | 0,00        | 0,00 | 0,0 | 0,00 | 2,32  | 10,97 | 3,40  | 1,12  | 0,00  | 0,00 | 0,61 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

|                    |    |             |             |            |              |              |              |              |              |              |             |              |              |              |              |              |             |
|--------------------|----|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 28                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 7,07         | 13,63        | 2,02         | 0,60         | 0,00        | 1,48         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 29                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 5,39         | 13,87        | 0,73        | 0,00         | 1,10         | 0,00         | 0,58         | 0,00         | 0,00        |
| 30                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 5,61         | 7,45         | 1,31         | 0,00        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 31                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 6,88         | 14,78        | 0,77        | 0,00         | 1,08         | 0,70         | 0,85         | 0,00         | 0,00        |
| 32                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 1,28         | 20,82        | 4,10         | 1,26         | 1,09        | 0,00         | 0,74         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 33                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 14,68        | 4,31         | 1,06         | 0,51        | 0,00         | 0,75         | 0,00         | 0,90         | 0,00         | 0,00        |
| 34                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,53         | 4,36         | 5,10         | 3,01         | 0,82        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 35                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 21,84        | 4,27         | 0,89         | 0,92        | 0,90         | 0,69         | 0,73         | 0,61         | 0,00         | 0,00        |
| 36                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 1,81         | 21,07        | 3,47         | 1,02         | 1,54        | 0,95         | 0,62         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 37                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 3,75         | 12,20        | 1,25         | 0,00         | 0,00        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 38                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 3,81         | 21,41        | 14,16        | 4,73         | 1,39         | 0,63         | 0,58        | 0,00         | 0,91         | 0,00         | 1,33         | 0,00         | 0,00        |
| 39                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 9,68         | 5,91         | 0,52        | 0,00         | 0,98         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 40                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 7,59         | 4,04         | 0,66        | 0,86         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 41                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 16,45        | 2,32         | 0,00        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 42                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 11,32        | 2,03         | 1,04        | 0,63         | 0,64         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 43                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 13,41        | 1,81         | 0,72        | 0,00         | 7,95         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 44                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 1,87         | 5,84         | 0,70        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,56         | 0,00         | 0,00        |
| 45                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 8,10         | 3,50         | 0,77         | 0,99        | 0,51         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 46                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 1,54         | 11,41        | 2,55         | 0,00        | 0,51         | 0,62         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 47                 | RT | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 2,72         | 3,07         | 1,22         | 0,00        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| 48                 | TR | 0,00        | 0,00        | 0,0        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 1,59         | 5,11         | 0,00        | 0,00         | 0,57         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| <b>Ср. знач.</b>   |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>0,08</b>  | <b>0,80</b>  | <b>1,91</b>  | <b>6,46</b>  | <b>5,99</b>  | <b>2,89</b>  | <b>0,47</b> | <b>0,32</b>  | <b>0,65</b>  | <b>0,10</b>  | <b>0,24</b>  | <b>0,01</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>Медиана</b>     |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>3,52</b>  | <b>4,41</b>  | <b>1,39</b>  | <b>0,56</b> | <b>0,00</b>  | <b>0,65</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>Макс. знач.</b> |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>Мин. знач.</b>  |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>3,81</b>  | <b>21,41</b> | <b>23,00</b> | <b>23,34</b> | <b>18,14</b> | <b>14,78</b> | <b>1,54</b> | <b>1,48</b>  | <b>7,95</b>  | <b>1,15</b>  | <b>1,49</b>  | <b>0,68</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>SD</b>          |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>0,55</b>  | <b>3,62</b>  | <b>4,52</b>  | <b>7,40</b>  | <b>4,85</b>  | <b>3,49</b>  | <b>0,44</b> | <b>0,41</b>  | <b>1,16</b>  | <b>0,26</b>  | <b>0,39</b>  | <b>0,10</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>CV</b>          |    | -           | -           | -          | <b>692,8</b> | <b>454,7</b> | <b>236,7</b> | <b>114,6</b> | <b>81,02</b> | <b>120,9</b> | <b>95,3</b> | <b>129,9</b> | <b>179,1</b> | <b>255,7</b> | <b>163,9</b> | <b>685,5</b> | -           |
| <b>SD</b>          |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>0,08</b>  | <b>0,52</b>  | <b>0,65</b>  | <b>1,07</b>  | <b>0,70</b>  | <b>0,50</b>  | <b>0,06</b> | <b>0,06</b>  | <b>0,17</b>  | <b>0,04</b>  | <b>0,06</b>  | <b>0,01</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>SE</b>          |    | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,0</b> | <b>0,08</b>  | <b>0,80</b>  | <b>1,91</b>  | <b>6,46</b>  | <b>5,99</b>  | <b>2,89</b>  | <b>0,47</b> | <b>0,32</b>  | <b>0,65</b>  | <b>0,10</b>  | <b>0,24</b>  | <b>0,01</b>  | <b>0,00</b> |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Таблица 1

Индивидуальные концентрации метилдопы в плазме крови добровольцев (мкг/мл) после однократного приёма **тестируемого** препарата метилдопы

| № доброво-<br>льца | Последова-<br>тельность | Период | Время, часы |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------|-------------------------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                    |                         |        | 0,00        | 0,25  | 0,50  | 0,75  | 1,00  | 1,25  | 1,50  | 1,75  | 2,00  | 2,25  | 2,50  | 3,00  | 4,00  | 6,00  | 9,00  | 12,00 | 18,00 | 24,00 |
| 1                  | TR                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,241 | 0,582 | 0,678 | 0,733 | 0,665 | 0,647 | 0,681 | 0,684 | 0,848 | 0,907 | 1,099 | 0,554 | 0,129 | 0,056 | 0,025 | 0,000 |
| 2                  | RT                      | 2      | 0,000       | 0,128 | 0,655 | 1,034 | 1,424 | 1,526 | 1,782 | 1,755 | 1,963 | 1,945 | 2,062 | 2,040 | 1,735 | 0,835 | 0,250 | 0,115 | 0,048 | 0,030 |
| 3                  | TR                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,000 | 0,038 | 0,142 | 0,274 | 0,396 | 0,473 | 0,457 | 0,457 | 0,440 | 0,475 | 0,537 | 0,550 | 0,145 | 0,060 | 0,024 | 0,000 |
| 4                  | RT                      | 2      | 0,000       | 0,033 | 0,209 | 0,419 | 0,572 | 0,832 | 0,751 | 0,712 | 0,606 | 0,605 | 0,609 | 0,639 | 0,554 | 0,278 | 0,102 | 0,043 | 0,020 | 0,000 |
| 5                  | TR                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,000 | 0,072 | 0,264 | 0,398 | 0,531 | 0,662 | 0,709 | 0,640 | 0,618 | 0,590 | 0,600 | 0,249 | 0,070 | 0,031 | 0,000 | 0,000 |
| 6                  | RT                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,030 | 0,130 | 0,256 | 0,495 | 0,791 | 1,106 | 1,352 | 1,413 | 1,589 | 1,822 | 2,416 | 1,278 | 0,360 | 0,151 | 0,056 | 0,036 |
| 7                  | RT                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,070 | 0,156 | 0,281 | 0,458 | 0,639 | 0,674 | 0,794 | 0,791 | 0,820 | 0,626 | 0,506 | 0,270 | 0,077 | 0,032 | 0,000 | 0,000 |
| 8                  | RT                      | 2      | 0,000       | 0,056 | 0,287 | 0,494 | 0,704 | 0,753 | 0,821 | 0,744 | 0,767 | 0,746 | 0,661 | 0,528 | 0,319 | 0,124 | 0,063 | 0,033 | 0,000 | 0,000 |
| 9                  | TR                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,033 | 0,186 | 0,309 | 0,505 | 0,984 | 1,419 | 1,823 | 1,691 | 2,051 | 2,185 | 1,672 | 0,872 | 0,268 | 0,120 | 0,048 | 0,030 |
| 10                 | RT                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,140 | 0,410 | 0,598 | 0,880 | 0,916 | 0,976 | 1,163 | 1,301 | 1,308 | 1,373 | 1,117 | 0,429 | 0,128 | 0,063 | 0,030 | 0,021 |
| 11                 | TR                      | 1      | 0,000       | 0,034 | 0,114 | 0,307 | 0,350 | 0,355 | 0,359 | 0,393 | 0,413 | 0,423 | 0,433 | 0,484 | 0,638 | 0,706 | 0,117 | 0,040 | 0,000 | 0,000 |
| 12                 | RT                      | 2      | 0,000       | 0,055 | 0,153 | 0,238 | 0,318 | 0,378 | 0,370 | 0,389 | 0,385 | 0,371 | 0,355 | 0,355 | 0,713 | 0,455 | 0,111 | 0,041 | 0,000 | 0,000 |
| 13                 | TR                      | 1      | 0,000       | 0,021 | 0,180 | 0,459 | 0,746 | 0,747 | 0,802 | 0,828 | 0,915 | 1,021 | 1,058 | 1,333 | 1,403 | 0,778 | 0,209 | 0,078 | 0,027 | 0,020 |
| 14                 | RT                      | 2      | 0,000       | 0,033 | 0,265 | 0,502 | 0,545 | 0,533 | 0,572 | 0,592 | 0,655 | 0,773 | 0,928 | 1,083 | 1,178 | 0,838 | 0,345 | 0,101 | 0,032 | 0,022 |
| 15                 | TR                      | 1      | 0,000       | 0,035 | 0,121 | 0,173 | 0,255 | 0,349 | 0,437 | 0,689 | 0,906 | 1,269 | 1,277 | 1,235 | 0,802 | 0,258 | 0,098 | 0,042 | 0,022 | 0,000 |
| 16                 | TR                      | 1      | 0,000       | 0,032 | 0,207 | 0,488 | 0,613 | 0,644 | 0,583 | 0,720 | 0,825 | 1,099 | 1,226 | 1,410 | 0,979 | 0,325 | 0,113 | 0,057 | 0,021 | 0,000 |
| 17                 | RT                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,131 | 0,208 | 0,232 | 0,233 | 0,257 | 0,309 | 0,339 | 0,366 | 0,481 | 0,713 | 0,634 | 0,424 | 0,147 | 0,049 | 0,022 | 0,000 |
| 18                 | TR                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,038 | 0,167 | 0,432 | 0,615 | 0,760 | 1,030 | 0,966 | 0,950 | 0,834 | 1,045 | 1,425 | 1,402 | 0,403 | 0,152 | 0,049 | 0,027 |
| 19                 | TR                      | 1      | 0,000       | 0,029 | 0,282 | 0,469 | 0,568 | 0,639 | 0,684 | 0,683 | 0,686 | 0,693 | 0,641 | 0,638 | 0,577 | 0,371 | 0,091 | 0,037 | 0,000 | 0,000 |
| 20                 | RT                      | 2      | 0,000       | 0,035 | 0,207 | 0,581 | 0,971 | 1,190 | 1,588 | 1,829 | 1,924 | 2,141 | 2,271 | 2,617 | 1,783 | 0,699 | 0,194 | 0,082 | 0,039 | 0,026 |

| № добровольца      | Последовательность | Период | Время, часы  |               |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |               |
|--------------------|--------------------|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
|                    |                    |        | 0,00         | 0,25          | 0,50         | 0,75         | 1,00         | 1,25         | 1,50         | 1,75         | 2,00         | 2,25         | 2,50         | 3,00         | 4,00         | 6,00         | 9,00         | 12,00        | 18,00        | 24,00         |
| 21                 | RT                 | 2      | 0,000        | 0,000         | 0,040        | 0,145        | 0,347        | 0,489        | 0,558        | 0,652        | 0,660        | 0,672        | 0,665        | 0,605        | 0,640        | 0,221        | 0,062        | 0,029        | 0,000        | 0,000         |
| 22                 | TR                 | 1      | 0,000        | 0,072         | 0,775        | 1,238        | 1,414        | 1,461        | 1,342        | 1,295        | 1,390        | 1,591        | 1,737        | 1,849        | 1,294        | 0,466        | 0,143        | 0,063        | 0,037        | 0,026         |
| 23                 | RT                 | 2      | 0,000        | 0,106         | 0,325        | 0,592        | 0,662        | 0,651        | 0,794        | 0,757        | 0,738        | 0,711        | 0,618        | 0,536        | 0,361        | 0,149        | 0,057        | 0,031        | 0,000        | 0,000         |
| 24                 | TR                 | 1      | 0,000        | 0,040         | 0,133        | 0,276        | 0,301        | 0,329        | 0,385        | 0,424        | 0,497        | 0,594        | 0,700        | 0,946        | 1,121        | 0,471        | 0,102        | 0,035        | 0,000        | 0,000         |
| <b>Ср. знач.</b>   |                    |        | <b>0,000</b> | <b>0,030</b>  | <b>0,193</b> | <b>0,390</b> | <b>0,541</b> | <b>0,644</b> | <b>0,740</b> | <b>0,823</b> | <b>0,901</b> | <b>0,956</b> | <b>1,010</b> | <b>1,085</b> | <b>1,004</b> | <b>0,542</b> | <b>0,158</b> | <b>0,064</b> | <b>0,021</b> | <b>0,010</b>  |
| <b>Ср. геом.</b>   |                    |        | -            | -             | -            | <b>0,296</b> | <b>0,458</b> | <b>0,573</b> | <b>0,663</b> | <b>0,742</b> | <b>0,800</b> | <b>0,845</b> | <b>0,880</b> | <b>0,932</b> | <b>0,879</b> | <b>0,453</b> | <b>0,134</b> | <b>0,056</b> | -            | -             |
| <b>Медиана</b>     |                    |        | <b>0,000</b> | <b>0,031</b>  | <b>0,147</b> | <b>0,359</b> | <b>0,489</b> | <b>0,574</b> | <b>0,675</b> | <b>0,701</b> | <b>0,753</b> | <b>0,760</b> | <b>0,827</b> | <b>0,927</b> | <b>0,891</b> | <b>0,461</b> | <b>0,123</b> | <b>0,053</b> | <b>0,022</b> | <b>0,000</b>  |
| <b>Мин. знач.</b>  |                    |        | <b>0,000</b> | <b>0,000</b>  | <b>0,000</b> | <b>0,038</b> | <b>0,142</b> | <b>0,233</b> | <b>0,257</b> | <b>0,309</b> | <b>0,339</b> | <b>0,366</b> | <b>0,355</b> | <b>0,355</b> | <b>0,319</b> | <b>0,124</b> | <b>0,057</b> | <b>0,029</b> | <b>0,000</b> | <b>0,000</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> |                    |        | <b>0,000</b> | <b>0,128</b>  | <b>0,775</b> | <b>1,238</b> | <b>1,424</b> | <b>1,526</b> | <b>1,782</b> | <b>1,829</b> | <b>1,963</b> | <b>2,141</b> | <b>2,271</b> | <b>2,617</b> | <b>2,416</b> | <b>1,402</b> | <b>0,403</b> | <b>0,152</b> | <b>0,056</b> | <b>0,036</b>  |
| <b>SD</b>          |                    |        | <b>0,000</b> | <b>0,035</b>  | <b>0,187</b> | <b>0,289</b> | <b>0,339</b> | <b>0,342</b> | <b>0,377</b> | <b>0,404</b> | <b>0,472</b> | <b>0,500</b> | <b>0,562</b> | <b>0,626</b> | <b>0,531</b> | <b>0,332</b> | <b>0,099</b> | <b>0,037</b> | <b>0,019</b> | <b>0,013</b>  |
| <b>CV</b>          |                    |        | <b>0,00</b>  | <b>117,49</b> | <b>96,98</b> | <b>73,96</b> | <b>62,73</b> | <b>53,02</b> | <b>50,97</b> | <b>49,09</b> | <b>52,39</b> | <b>52,26</b> | <b>55,65</b> | <b>57,74</b> | <b>52,91</b> | <b>61,28</b> | <b>62,81</b> | <b>58,35</b> | <b>91,08</b> | <b>135,32</b> |
| <b>SE</b>          |                    |        | <b>0,000</b> | <b>0,007</b>  | <b>0,038</b> | <b>0,059</b> | <b>0,069</b> | <b>0,070</b> | <b>0,077</b> | <b>0,082</b> | <b>0,096</b> | <b>0,102</b> | <b>0,115</b> | <b>0,128</b> | <b>0,108</b> | <b>0,068</b> | <b>0,020</b> | <b>0,008</b> | <b>0,004</b> | <b>0,003</b>  |

Таблица 2

Индивидуальные концентрации метилдопы в плазме крови добровольцев (мкг/мл) после однократного приёма референтного препарата «Допегит»

| № доброво-<br>льца | Последова-<br>тельность | Период | Время, часы |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------|-------------------------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                    |                         |        | 0,00        | 0,25  | 0,50  | 0,75  | 1,00  | 1,25  | 1,50  | 1,75  | 2,00  | 2,25  | 2,50  | 3,00  | 4,00  | 6,00  | 9,00  | 12,00 | 18,00 | 24,00 |
| 1                  | TR                      | 2      | 0,000       | 0,034 | 0,376 | 0,602 | 0,869 | 1,004 | 1,280 | 1,257 | 1,156 | 1,118 | 1,074 | 1,067 | 1,411 | 0,831 | 0,200 | 0,068 | 0,029 | 0,020 |
| 2                  | RT                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,197 | 0,272 | 0,543 | 0,894 | 1,256 | 1,776 | 1,962 | 2,124 | 2,275 | 2,231 | 1,461 | 0,511 | 0,181 | 0,084 | 0,039 | 0,028 |
| 3                  | TR                      | 2      | 0,000       | 0,020 | 0,119 | 0,276 | 0,489 | 0,690 | 1,072 | 1,053 | 0,947 | 0,822 | 0,795 | 0,820 | 0,575 | 0,227 | 0,078 | 0,039 | 0,000 | 0,000 |
| 4                  | RT                      | 1      | 0,000       | 0,052 | 0,195 | 0,318 | 0,476 | 0,537 | 0,583 | 0,668 | 0,774 | 0,778 | 0,759 | 0,852 | 0,854 | 0,424 | 0,123 | 0,052 | 0,024 | 0,000 |
| 5                  | TR                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,112 | 0,297 | 0,482 | 0,507 | 0,594 | 0,550 | 0,564 | 0,524 | 0,559 | 0,515 | 0,460 | 0,192 | 0,062 | 0,028 | 0,000 | 0,000 |
| 6                  | RT                      | 1      | 0,000       | 0,095 | 0,405 | 0,738 | 0,892 | 1,068 | 1,183 | 1,201 | 1,365 | 1,394 | 1,385 | 1,301 | 1,154 | 0,670 | 0,228 | 0,098 | 0,040 | 0,027 |
| 7                  | RT                      | 1      | 0,000       | 0,035 | 0,240 | 0,476 | 0,654 | 0,677 | 0,679 | 0,615 | 0,598 | 0,598 | 0,642 | 0,745 | 0,642 | 0,203 | 0,065 | 0,034 | 0,022 | 0,000 |
| 8                  | RT                      | 1      | 0,000       | 0,031 | 0,186 | 0,556 | 0,882 | 1,030 | 1,143 | 1,248 | 1,320 | 1,376 | 1,490 | 1,638 | 1,256 | 0,533 | 0,136 | 0,070 | 0,030 | 0,021 |
| 9                  | TR                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,095 | 0,318 | 0,482 | 0,826 | 1,275 | 1,289 | 1,389 | 1,392 | 1,522 | 1,836 | 1,282 | 0,556 | 0,210 | 0,092 | 0,039 | 0,026 |
| 10                 | RT                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,106 | 0,298 | 0,560 | 0,737 | 0,940 | 1,232 | 1,487 | 1,504 | 1,419 | 1,409 | 1,161 | 0,439 | 0,137 | 0,065 | 0,032 | 0,023 |
| 11                 | TR                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,024 | 0,145 | 0,331 | 0,431 | 0,622 | 0,771 | 0,827 | 0,968 | 1,212 | 1,394 | 1,063 | 1,352 | 0,230 | 0,066 | 0,026 | 0,000 |
| 12                 | RT                      | 1      | 0,000       | 0,072 | 0,242 | 0,507 | 0,744 | 0,744 | 0,778 | 0,785 | 0,893 | 1,093 | 1,271 | 1,786 | 1,687 | 0,598 | 0,150 | 0,064 | 0,025 | 0,000 |
| 13                 | TR                      | 2      | 0,000       | 0,038 | 0,297 | 0,626 | 0,872 | 0,903 | 1,070 | 1,164 | 1,288 | 1,392 | 1,528 | 1,547 | 1,063 | 0,548 | 0,146 | 0,066 | 0,034 | 0,022 |
| 14                 | RT                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,130 | 0,453 | 0,669 | 0,697 | 0,621 | 0,592 | 0,572 | 0,618 | 0,686 | 0,855 | 0,963 | 0,460 | 0,124 | 0,046 | 0,020 | 0,000 |
| 15                 | TR                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,044 | 0,160 | 0,282 | 0,410 | 0,522 | 0,570 | 0,569 | 0,514 | 0,478 | 0,492 | 0,426 | 0,165 | 0,047 | 0,024 | 0,000 | 0,000 |
| 16                 | TR                      | 2      | 0,000       | 0,054 | 0,191 | 0,503 | 0,494 | 0,524 | 0,502 | 0,569 | 0,646 | 0,710 | 0,811 | 0,958 | 0,967 | 0,353 | 0,109 | 0,047 | 0,023 | 0,000 |
| 17                 | RT                      | 1      | 0,000       | 0,000 | 0,126 | 0,351 | 0,536 | 0,673 | 0,649 | 0,669 | 0,574 | 0,581 | 0,633 | 0,673 | 0,798 | 0,692 | 0,366 | 0,115 | 0,032 | 0,021 |
| 18                 | TR                      | 2      | 0,000       | 0,000 | 0,028 | 0,139 | 0,236 | 0,495 | 1,089 | 1,290 | 1,358 | 1,389 | 1,379 | 1,371 | 1,138 | 1,261 | 0,328 | 0,112 | 0,038 | 0,025 |
| 19                 | TR                      | 2      | 0,000       | 0,033 | 0,172 | 0,440 | 0,622 | 0,656 | 0,825 | 0,876 | 0,961 | 0,889 | 0,829 | 0,762 | 1,013 | 0,455 | 0,149 | 0,052 | 0,000 | 0,000 |
| 20                 | RT                      | 1      | 0,000       | 0,028 | 0,265 | 0,616 | 0,861 | 1,062 | 1,225 | 1,263 | 1,364 | 1,273 | 1,215 | 1,408 | 1,371 | 0,448 | 0,127 | 0,052 | 0,030 | 0,021 |
| 21                 | RT                      | 1      | 0,000       | 0,077 | 0,219 | 0,570 | 0,446 | 0,470 | 0,519 | 0,658 | 0,854 | 0,976 | 1,043 | 1,007 | 0,772 | 0,286 | 0,081 | 0,032 | 0,000 | 0,000 |

| № добро-<br>вольца | Последова-<br>тельность | Период | Время, часы  |               |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |               |
|--------------------|-------------------------|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
|                    |                         |        | 0,00         | 0,25          | 0,50         | 0,75         | 1,00         | 1,25         | 1,50         | 1,75         | 2,00         | 2,25         | 2,50         | 3,00         | 4,00         | 6,00         | 9,00         | 12,00        | 18,00        | 24,00         |
| 22                 | TR                      | 2      | 0,000        | 0,000         | 0,079        | 0,235        | 0,613        | 1,004        | 1,143        | 1,153        | 1,125        | 1,154        | 1,147        | 1,216        | 1,224        | 0,794        | 0,209        | 0,082        | 0,041        | 0,027         |
| 23                 | RT                      | 1      | 0,000        | 0,100         | 0,359        | 0,531        | 0,819        | 1,159        | 1,083        | 1,304        | 1,214        | 1,248        | 1,173        | 0,881        | 0,540        | 0,221        | 0,086        | 0,034        | 0,000        | 0,000         |
| 24                 | TR                      | 2      | 0,000        | 0,000         | 0,122        | 0,245        | 0,379        | 0,545        | 0,592        | 0,766        | 0,807        | 0,873        | 0,871        | 0,733        | 0,725        | 0,269        | 0,078        | 0,033        | 0,000        | 0,000         |
| <b>Ср. знач.</b>   |                         |        | <b>0,000</b> | <b>0,028</b>  | <b>0,180</b> | <b>0,403</b> | <b>0,593</b> | <b>0,739</b> | <b>0,885</b> | <b>0,972</b> | <b>1,026</b> | <b>1,055</b> | <b>1,092</b> | <b>1,146</b> | <b>1,000</b> | <b>0,520</b> | <b>0,152</b> | <b>0,061</b> | <b>0,022</b> | <b>0,011</b>  |
| <b>Ср. геом.</b>   |                         |        | -            | -             | 0,145        | 0,365        | 0,558        | 0,705        | 0,840        | 0,917        | 0,963        | 0,986        | 1,019        | 1,062        | 0,940        | 0,447        | 0,134        | 0,055        | -            | -             |
| <b>Медиана</b>     |                         |        | <b>0,000</b> | <b>0,024</b>  | <b>0,179</b> | <b>0,396</b> | <b>0,552</b> | <b>0,694</b> | <b>0,883</b> | <b>0,965</b> | <b>0,954</b> | <b>1,035</b> | <b>1,111</b> | <b>1,037</b> | <b>1,038</b> | <b>0,458</b> | <b>0,137</b> | <b>0,058</b> | <b>0,026</b> | <b>0,000</b>  |
| <b>Мин. знач.</b>  |                         |        | <b>0,000</b> | <b>0,000</b>  | <b>0,024</b> | <b>0,139</b> | <b>0,236</b> | <b>0,410</b> | <b>0,502</b> | <b>0,550</b> | <b>0,564</b> | <b>0,514</b> | <b>0,478</b> | <b>0,492</b> | <b>0,426</b> | <b>0,165</b> | <b>0,047</b> | <b>0,024</b> | <b>0,000</b> | <b>0,000</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> |                         |        | <b>0,000</b> | <b>0,100</b>  | <b>0,405</b> | <b>0,738</b> | <b>0,892</b> | <b>1,159</b> | <b>1,280</b> | <b>1,776</b> | <b>1,962</b> | <b>2,124</b> | <b>2,275</b> | <b>2,231</b> | <b>1,687</b> | <b>1,352</b> | <b>0,366</b> | <b>0,115</b> | <b>0,041</b> | <b>0,028</b>  |
| <b>SD</b>          |                         |        | <b>0,000</b> | <b>0,032</b>  | <b>0,106</b> | <b>0,170</b> | <b>0,199</b> | <b>0,229</b> | <b>0,285</b> | <b>0,335</b> | <b>0,370</b> | <b>0,391</b> | <b>0,413</b> | <b>0,451</b> | <b>0,336</b> | <b>0,306</b> | <b>0,081</b> | <b>0,026</b> | <b>0,015</b> | <b>0,012</b>  |
| <b>CV</b>          |                         |        | <b>0,00</b>  | <b>116,29</b> | <b>58,68</b> | <b>42,22</b> | <b>33,53</b> | <b>30,97</b> | <b>32,15</b> | <b>34,47</b> | <b>36,06</b> | <b>37,12</b> | <b>37,81</b> | <b>39,38</b> | <b>33,59</b> | <b>58,86</b> | <b>53,11</b> | <b>43,11</b> | <b>70,58</b> | <b>112,47</b> |
| <b>SE</b>          |                         |        | <b>0,000</b> | <b>0,007</b>  | <b>0,022</b> | <b>0,035</b> | <b>0,041</b> | <b>0,047</b> | <b>0,058</b> | <b>0,068</b> | <b>0,075</b> | <b>0,080</b> | <b>0,084</b> | <b>0,092</b> | <b>0,069</b> | <b>0,063</b> | <b>0,016</b> | <b>0,005</b> | <b>0,003</b> | <b>0,002</b>  |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Таблица 1

Индивидуальные концентрации **мебевериновой кислоты** в плазме крови добровольцев (нг/мл) после однократного приёма препарата «Дюспаталин»

| № доброво-<br>вольца | Время, часы |       |       |       |       |       |        |        |        |       |       |       |       |       |      |
|----------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|                      | 0,0         | 0,5   | 1,0   | 1,5   | 2,0   | 2,5   | 3,0    | 3,5    | 4,0    | 5,0   | 6,0   | 8,0   | 10,0  | 12,0  | 24,0 |
| 1                    | 0,00        | 0,00  | 12,50 | 18,80 | 24,80 | 32,30 | 29,90  | 37,70  | 38,20  | 27,90 | 23,10 | 12,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 2                    | 0,00        | 0,00  | 36,90 | 71,30 | 80,30 | 77,60 | 67,90  | 76,00  | 64,40  | 91,90 | 59,90 | 24,50 | 14,20 | 0,00  | 0,00 |
| 3                    | 0,00        | 0,00  | 28,20 | 47,20 | 58,90 | 52,10 | 48,80  | 53,10  | 53,80  | 39,60 | 31,50 | 19,50 | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 4                    | 0,00        | 0,00  | 23,00 | 23,30 | 30,20 | 36,00 | 32,90  | 29,20  | 34,00  | 22,00 | 16,70 | 14,40 | 11,80 | 0,00  | 0,00 |
| 5                    | 0,00        | 0,00  | 28,70 | 46,80 | 48,50 | 53,90 | 58,70  | 57,80  | 50,40  | 40,50 | 31,20 | 26,70 | 13,60 | 0,00  | 0,00 |
| 6                    | 0,00        | 0,00  | 20,50 | 21,20 | 25,80 | 29,40 | 26,10  | 27,70  | 33,60  | 46,60 | 28,30 | 17,50 | 10,50 | 0,00  | 0,00 |
| 7                    | 0,00        | 0,00  | 34,20 | 51,60 | 45,80 | 53,10 | 51,80  | 46,50  | 48,70  | 37,30 | 28,70 | 15,90 | 10,50 | 10,90 | 0,00 |
| 8                    | 0,00        | 0,00  | 0,00  | 42,50 | 50,00 | 52,70 | 167,80 | 173,50 | 152,90 | 91,60 | 52,80 | 20,50 | 12,00 | 0,00  | 0,00 |
| 9                    | 0,00        | 0,00  | 0,00  | 36,70 | 46,10 | 40,20 | 49,60  | 55,80  | 54,50  | 41,50 | 30,50 | 17,90 | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 10                   | 0,00        | 0,00  | 0,00  | 19,80 | 21,30 | 22,10 | 22,30  | 16,50  | 12,10  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 11                   | 0,00        | 0,00  | 60,60 | 63,20 | 75,70 | 93,50 | 104,10 | 123,00 | 105,70 | 94,70 | 65,20 | 26,00 | 17,20 | 0,00  | 0,00 |
| 12                   | 0,00        | 0,00  | 16,80 | 31,40 | 30,00 | 34,30 | 36,30  | 39,40  | 35,00  | 22,20 | 15,30 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 13                   | 0,00        | 22,70 | 26,40 | 26,70 | 34,30 | 44,80 | 51,30  | 59,00  | 52,60  | 36,00 | 25,10 | 16,90 | 11,50 | 0,00  | 0,00 |
| 14                   | 0,00        | 0,00  | 36,20 | 35,30 | 40,70 | 46,70 | 59,60  | 66,70  | 61,00  | 44,00 | 34,80 | 17,70 | 10,50 | 0,00  | 0,00 |
| 15                   | 0,00        | 0,00  | 0,00  | 42,90 | 35,70 | 30,90 | 30,10  | 34,30  | 32,80  | 32,00 | 25,60 | 17,00 | 11,30 | 0,00  | 0,00 |
| 16                   | 0,00        | 0,00  | 10,40 | 26,70 | 51,50 | 57,80 | 64,30  | 65,80  | 63,10  | 83,20 | 55,80 | 40,00 | 15,80 | 0,00  | 0,00 |
| 17                   | 0,00        | 10,40 | 21,40 | 26,80 | 32,00 | 28,80 | 26,80  | 32,40  | 29,50  | 27,50 | 22,40 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 18                   | 0,00        | 13,60 | 36,00 | 49,50 | 56,90 | 49,80 | 44,70  | 41,90  | 38,50  | 26,10 | 21,50 | 13,20 | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 19                   | 0,00        | 0,00  | 22,70 | 27,90 | 31,00 | 37,80 | 34,20  | 33,50  | 35,40  | 26,90 | 15,90 | 10,90 | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| 20                   | 0,00        | 0,00  | 38,90 | 55,60 | 59,90 | 56,50 | 44,50  | 44,60  | 39,20  | 26,70 | 21,30 | 11,30 | 0,00  | 0,00  | 0,00 |



|                    |             |               |              |              |              |               |               |               |               |              |              |              |              |              |             |
|--------------------|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>21</b>          | 0,00        | 0,00          | 44,20        | 47,60        | 70,90        | 106,70        | 115,00        | 115,60        | 103,30        | 78,80        | 54,80        | 23,40        | 15,60        | 0,00         | 0,00        |
| <b>22</b>          | 0,00        | 0,00          | 0,00         | 13,50        | 27,50        | 26,30         | 24,80         | 19,20         | 15,70         | 11,80        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| <b>23</b>          | 0,00        | 0,00          | 22,20        | 30,80        | 42,00        | 64,70         | 80,10         | 83,40         | 76,30         | 66,30        | 42,70        | 20,00        | 11,40        | 0,00         | 0,00        |
| <b>24</b>          | 0,00        | 0,00          | 0,00         | 31,90        | 24,90        | 22,20         | 27,10         | 30,20         | 33,50         | 37,80        | 29,10        | 15,80        | 0,00         | 0,00         | 0,00        |
| <b>Ср. знач.</b>   | <b>0,00</b> | <b>1,95</b>   | <b>21,66</b> | <b>37,04</b> | <b>43,53</b> | <b>47,93</b>  | <b>54,11</b>  | <b>56,78</b>  | <b>52,68</b>  | <b>43,87</b> | <b>30,51</b> | <b>15,88</b> | <b>6,91</b>  | <b>0,45</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>Ср. геом.</b>   | -           | -             | -            | <b>34,19</b> | <b>40,59</b> | <b>43,98</b>  | <b>46,79</b>  | <b>48,28</b>  | <b>45,44</b>  | -            | -            | -            | -            | -            | -           |
| <b>Медиана</b>     | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>   | <b>22,45</b> | <b>33,60</b> | <b>41,35</b> | <b>45,75</b>  | <b>46,75</b>  | <b>45,55</b>  | <b>43,95</b>  | <b>37,55</b> | <b>28,50</b> | <b>16,95</b> | <b>10,50</b> | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>Мин. знач.</b>  | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>  | <b>13,50</b> | <b>21,30</b> | <b>22,10</b>  | <b>22,30</b>  | <b>16,50</b>  | <b>12,10</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>Макс. знач.</b> | <b>0,00</b> | <b>22,70</b>  | <b>60,60</b> | <b>71,30</b> | <b>80,30</b> | <b>106,70</b> | <b>167,80</b> | <b>173,50</b> | <b>152,90</b> | <b>94,70</b> | <b>65,20</b> | <b>40,00</b> | <b>17,20</b> | <b>10,90</b> | <b>0,00</b> |
| <b>SD</b>          | <b>0,00</b> | <b>5,59</b>   | <b>16,55</b> | <b>14,85</b> | <b>16,85</b> | <b>21,38</b>  | <b>34,17</b>  | <b>36,64</b>  | <b>31,31</b>  | <b>26,45</b> | <b>17,21</b> | <b>9,50</b>  | <b>6,70</b>  | <b>2,22</b>  | <b>0,00</b> |
| <b>CV</b>          | -           | <b>287,05</b> | <b>76,40</b> | <b>40,08</b> | <b>38,71</b> | <b>44,61</b>  | <b>63,14</b>  | <b>64,53</b>  | <b>59,44</b>  | <b>60,28</b> | <b>56,40</b> | <b>59,81</b> | <b>96,93</b> | <b>489,9</b> | -           |
| <b>SE</b>          | <b>0,00</b> | <b>1,14</b>   | <b>3,38</b>  | <b>3,03</b>  | <b>3,44</b>  | <b>4,36</b>   | <b>6,97</b>   | <b>7,48</b>   | <b>6,39</b>   | <b>5,40</b>  | <b>3,51</b>  | <b>1,94</b>  | <b>1,37</b>  | <b>0,45</b>  | <b>0,00</b> |

Таблица 2

Индивидуальные концентрации деметилированной мебевериновой кислоты в плазме крови добровольцев (нг/мл) после однократного приёма препарата «Дюспаталин»

| № добровольца | Время, часы |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |
|---------------|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|               | 0,0         | 0,5   | 1,0    | 1,5    | 2,0    | 2,5    | 3,0    | 3,5    | 4,0    | 5,0    | 6,0    | 8,0    | 10,0   | 12,0   | 24,0  |
| <b>1</b>      | 0,00        | 27,20 | 65,30  | 132,60 | 185,20 | 195,60 | 160,00 | 189,90 | 179,30 | 155,20 | 131,70 | 85,70  | 62,00  | 70,90  | 34,80 |
| <b>2</b>      | 0,00        | 12,40 | 148,70 | 267,40 | 287,10 | 268,30 | 252,60 | 309,10 | 240,30 | 366,60 | 283,20 | 192,70 | 145,20 | 92,80  | 32,10 |
| <b>3</b>      | 0,00        | 26,10 | 101,80 | 192,30 | 197,50 | 187,30 | 169,00 | 193,60 | 187,10 | 160,70 | 119,50 | 76,10  | 50,70  | 74,20  | 38,20 |
| <b>4</b>      | 0,00        | 0,00  | 98,30  | 97,70  | 151,00 | 160,40 | 137,50 | 118,10 | 151,20 | 127,50 | 98,00  | 113,90 | 113,80 | 80,70  | 0,00  |
| <b>5</b>      | 0,00        | 10,30 | 99,70  | 150,00 | 151,70 | 165,30 | 190,60 | 185,80 | 168,30 | 161,90 | 164,50 | 200,30 | 122,40 | 81,00  | 22,00 |
| <b>6</b>      | 0,00        | 0,00  | 53,40  | 72,40  | 107,30 | 114,20 | 103,70 | 115,00 | 119,00 | 191,90 | 158,80 | 180,50 | 117,00 | 94,10  | 38,90 |
| <b>7</b>      | 0,00        | 25,80 | 110,60 | 240,60 | 230,60 | 226,40 | 228,60 | 212,10 | 225,70 | 160,60 | 129,40 | 110,90 | 89,70  | 131,00 | 46,20 |
| <b>8</b>      | 0,00        | 0,00  | 0,00   | 87,10  | 202,60 | 182,20 | 493,60 | 607,40 | 457,00 | 305,30 | 168,10 | 95,50  | 62,10  | 43,80  | 0,00  |
| <b>9</b>      | 0,00        | 0,00  | 12,10  | 129,10 | 166,00 | 129,40 | 189,30 | 219,10 | 252,00 | 229,10 | 190,40 | 140,80 | 97,80  | 82,10  | 16,30 |
| <b>10</b>     | 0,00        | 0,00  | 24,20  | 62,60  | 102,00 | 104,60 | 114,60 | 86,70  | 69,40  | 69,40  | 64,70  | 48,30  | 43,00  | 44,20  | 20,60 |

|                    |             |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |              |
|--------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>11</b>          | 0,00        | 0,00          | 196,20        | 330,50        | 414,60        | 421,10        | 426,40        | 514,90        | 436,40        | 438,50        | 302,60        | 132,00        | 94,50         | 52,60         | 0,00         |
| <b>12</b>          | 0,00        | 67,50         | 166,40        | 310,10        | 314,90        | 334,00        | 408,30        | 363,40        | 380,30        | 252,70        | 193,50        | 103,70        | 87,80         | 59,10         | 20,90        |
| <b>13</b>          | 0,00        | 71,00         | 84,40         | 92,40         | 125,40        | 174,50        | 195,80        | 231,60        | 218,60        | 179,30        | 132,50        | 122,20        | 98,10         | 58,40         | 26,50        |
| <b>14</b>          | 0,00        | 0,00          | 106,80        | 142,30        | 169,50        | 192,40        | 223,80        | 264,60        | 228,70        | 177,60        | 162,50        | 94,60         | 58,20         | 37,70         | 0,00         |
| <b>15</b>          | 0,00        | 0,00          | 10,40         | 202,90        | 166,20        | 134,40        | 129,80        | 158,00        | 158,50        | 200,40        | 153,30        | 107,10        | 89,40         | 101,20        | 37,50        |
| <b>16</b>          | 0,00        | 0,00          | 31,20         | 114,70        | 239,10        | 260,50        | 286,90        | 291,00        | 254,60        | 400,60        | 239,80        | 173,40        | 78,80         | 51,60         | 0,00         |
| <b>17</b>          | 0,00        | 48,10         | 113,50        | 174,90        | 231,80        | 199,10        | 167,60        | 213,20        | 192,00        | 185,40        | 173,50        | 103,40        | 122,50        | 104,60        | 22,80        |
| <b>18</b>          | 0,00        | 23,50         | 110,90        | 190,00        | 268,70        | 225,70        | 211,70        | 195,30        | 176,10        | 154,60        | 171,30        | 120,60        | 82,90         | 76,30         | 22,10        |
| <b>19</b>          | 0,00        | 0,00          | 130,00        | 196,00        | 248,10        | 300,30        | 267,50        | 265,40        | 294,90        | 289,30        | 179,80        | 142,20        | 81,30         | 72,80         | 27,20        |
| <b>20</b>          | 0,00        | 22,50         | 118,30        | 198,50        | 203,90        | 170,50        | 131,70        | 127,30        | 142,60        | 134,40        | 119,60        | 90,20         | 61,30         | 64,30         | 30,90        |
| <b>21</b>          | 0,00        | 0,00          | 102,20        | 151,10        | 203,60        | 313,90        | 331,30        | 364,50        | 332,50        | 275,30        | 210,30        | 112,50        | 75,40         | 47,50         | 14,60        |
| <b>22</b>          | 0,00        | 0,00          | 16,90         | 103,30        | 258,70        | 398,50        | 292,20        | 203,90        | 152,80        | 156,70        | 128,60        | 103,50        | 72,60         | 51,30         | 27,20        |
| <b>23</b>          | 0,00        | 0,00          | 160,00        | 182,90        | 268,90        | 355,60        | 453,10        | 499,20        | 424,40        | 392,60        | 225,90        | 120,40        | 81,60         | 61,80         | 15,20        |
| <b>24</b>          | 0,00        | 0,00          | 54,80         | 186,80        | 154,30        | 96,90         | 102,90        | 106,40        | 108,00        | 143,00        | 102,20        | 53,80         | 37,00         | 42,70         | 10,90        |
| <b>Ср. знач.</b>   | <b>0,00</b> | <b>13,93</b>  | <b>88,17</b>  | <b>167,01</b> | <b>210,36</b> | <b>221,30</b> | <b>236,19</b> | <b>251,48</b> | <b>231,24</b> | <b>221,19</b> | <b>166,82</b> | <b>117,68</b> | <b>84,38</b>  | <b>69,86</b>  | <b>21,04</b> |
| <b>Ср. геом.</b>   | <b>-</b>    | <b>-</b>      | <b>-</b>      | <b>152,86</b> | <b>199,34</b> | <b>204,08</b> | <b>212,62</b> | <b>222,01</b> | <b>209,10</b> | <b>202,11</b> | <b>157,77</b> | <b>111,36</b> | <b>80,10</b>  | <b>66,39</b>  | <b>-</b>     |
| <b>Медиана</b>     | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>   | <b>100,75</b> | <b>163,00</b> | <b>203,10</b> | <b>194,00</b> | <b>203,75</b> | <b>212,65</b> | <b>205,30</b> | <b>182,35</b> | <b>163,50</b> | <b>111,70</b> | <b>82,25</b>  | <b>67,60</b>  | <b>22,05</b> |
| <b>Мин. знач.</b>  | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>62,60</b>  | <b>102,00</b> | <b>96,90</b>  | <b>102,90</b> | <b>86,70</b>  | <b>69,40</b>  | <b>69,40</b>  | <b>64,70</b>  | <b>48,30</b>  | <b>37,00</b>  | <b>37,70</b>  | <b>0,00</b>  |
| <b>Макс. знач.</b> | <b>0,00</b> | <b>71,00</b>  | <b>196,20</b> | <b>330,50</b> | <b>414,60</b> | <b>421,10</b> | <b>493,60</b> | <b>607,40</b> | <b>457,00</b> | <b>438,50</b> | <b>302,60</b> | <b>200,30</b> | <b>145,20</b> | <b>131,00</b> | <b>46,20</b> |
| <b>SD</b>          | <b>0,00</b> | <b>21,53</b>  | <b>53,89</b>  | <b>70,67</b>  | <b>71,34</b>  | <b>91,73</b>  | <b>114,01</b> | <b>134,83</b> | <b>106,53</b> | <b>98,05</b>  | <b>56,55</b>  | <b>39,07</b>  | <b>26,90</b>  | <b>23,25</b>  | <b>13,91</b> |
| <b>CV</b>          | <b>-</b>    | <b>154,49</b> | <b>61,11</b>  | <b>42,32</b>  | <b>33,91</b>  | <b>41,45</b>  | <b>48,27</b>  | <b>53,61</b>  | <b>46,07</b>  | <b>44,33</b>  | <b>33,90</b>  | <b>33,20</b>  | <b>31,88</b>  | <b>33,28</b>  | <b>66,13</b> |
| <b>SE</b>          | <b>0,00</b> | <b>4,39</b>   | <b>11,00</b>  | <b>14,43</b>  | <b>14,56</b>  | <b>18,72</b>  | <b>23,27</b>  | <b>27,52</b>  | <b>21,75</b>  | <b>20,01</b>  | <b>11,54</b>  | <b>7,97</b>   | <b>5,49</b>   | <b>4,75</b>   | <b>2,84</b>  |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 7

|   |  |
|---|--|
| <p align="center"><b>«УТВЕРЖДАЮ»</b></p> <p align="center">Главный врач ГБУЗ ЯО<br/>«Ярославская областная клиническая<br/>наркологическая больница»</p> <p align="right">А.В. Волков<br/>_____ 2018 г.</p>  | <p align="center"><b>«УТВЕРЖДАЮ»</b></p> <p align="center">Зав. химико-токсикологической<br/>лабораторией</p> <p align="right">Ершов М.Б.<br/>_____ 2018 г.</p>  |
|---|--|

## АКТ

внедрения результатов диссертационного исследования Яичкова И.И. на тему:  
«Разработка методик количественного определения в плазме и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы»

Объект внедрения: методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови с применением методов газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим (ВЭЖХ-МС) и tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Цель внедрения: измерение концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови при проведении терапевтического лекарственного мониторинга, а также диагностики острых отравлений.

Результаты внедрения: разработанные методики позволяют быстро и достоверно определить концентрацию микофеноловой кислоты в плазме крови. Использование ГХ-МС-методики также даёт возможность одновременно с идентификацией микофеноловой кислоты проводить скрининг на наличие в плазме крови пациента других лекарственных препаратов.

Председатель комиссии:  
зав. химико-токсикологической лабораторией  
Члены комиссии:  
врач КЛД  
лабораторный техник



Ершов М.Б.

Ионова Е.Б.

Пошехонова Н.А.

УТВЕРЖДАЮ



Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «Ярославский  
государственный педагогический  
университет им. К.Д. Ушинского»

А.М. Ходырев

20 18 г

## АКТ

внедрения результатов диссертационного исследования Яичкова И.И. на тему:  
«Разработка методик количественного определения в плазме и проведение  
фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты,  
метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные  
группы»

Настоящим актом удостоверяется, что в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского» используются методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме крови методами ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, метилдопы в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС, предложенные в диссертационной работе Яичкова И.И. для проведения фармакокинетических исследований.

Директор Центра трансфера фармацевтических  
технологий им. М.В. Дорогова  
ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского»

М.К. Корсаков

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Квинта-Аналитика Ярославль»

Л.Н. Шитов

« 21 » мая 20 18 г.

## АКТ

внедрения результатов диссертационного исследования Яичкова И.И. на тему:  
«Разработка методик количественного определения в плазме и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы»

Настоящим актом удостоверяется, что в биоаналитической лаборатории «Квинта-Аналитика Ярославль» применяются методики количественного определения в плазме крови микофеноловой кислоты методами ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, метилдопы, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот методом ВЭЖХ-МС/МС, предложенные в диссертационной работе Яичкова И.И., для проведения фармакокинетических исследований. Материалы литературного обзора, а также методические подходы к разработке биоаналитических методик для анализа веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы и образующих нестабильные метаболиты, используются при периодическом обучении сотрудников лаборатории.

Старший аналитик  
ООО «Квинта-Аналитика Ярославль»,  
канд. фарм. наук



Ю.А. Джурко