<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113>
УДК 615.03

Оригинальная статья / Research article

Определение лаппаконитина, дитерпенового алкалоида, получаемого из растений *Aconitum leucostomum*, и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека

О. А. Арчакова^{1*}, Т. Н. Комаров^{1,2}, А. В. Рогов³, Д. С. Щелгачева¹, А. В. Алешина¹,
Н. С. Багаева¹, И. Е. Шохин¹

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

³ АО «Фармцентр ВИЛАР», 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 29

*Контактное лицо: Арчакова Ольга А. E-mail: o.archakova@cpha.ru

ORCID: О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; А. В. Рогов – <https://orcid.org/0000-0001-8791-1971>;
Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; А. В. Алешина – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 16.07.2020

Статья принята в печать: 20.08.2021

Статья опубликована: 25.08.2021

Резюме

Введение. Лаппаконитин представляет собой алкалоид, содержащийся в корнях и надземной части аконита белоустого (*Aconitum leucostomum* Vorosh.) и обладающий антиаритмическим действием. После приема препаратов лаппаконитина в организме человека образуется 8 изученных фармакологически активных метаболитов, наибольшую активность среди которых проявляет N-дезацетиллаппаконитин. Фармакокинетика препаратов лаппаконитина изучена недостаточно. Препараты лаппаконитина имеют узкий терапевтический диапазон и обладают большим количеством побочных эффектов, поэтому для оценки безопасности применения препаратов лаппаконитина возникает необходимость полноценного изучения его фармакокинетики.

Цель. Целью исследования является разработка методики определения лаппаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Материалы и методы. Определение лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения ацетонитрилом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика определения лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика определения лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 0,50–50,00 нг/мл в биологической матрице для лаппаконитина и 0,50–100,00 нг/мл в биологической матрице для N-дезацетиллаппаконитина. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований препаратов лаппаконитина.

Ключевые слова: лаппаконитин, N-дезацетиллаппаконитин, плазма, кровь, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. А. В. Рогов и И. Е. Шохин отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Рогов А. В., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Шохин И. Е. Определение лаппаконитина, дитерпенового алкалоида, получаемого из растений *Aconitum leucostomum*, и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):105–113. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113>

Determination of Lappaconitin, Diterpene Alkaloids Obtained from Plants *Aconitum Leucostomum*, and its Active Metabolite N-desacetylappaconitin in Human Plasma and Blood

Olga A. Archakova^{1*}, Timofey N. Komarov^{1,2}, Anton V. Rogov³, Dana S. Shchelgacheva¹,
Alexandra A. Aleshina¹, Natalia S. Bagaeva¹, Igor E. Shohin¹

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

³ JSC "Pharmcenter VILAR", 7/29, Green str., Moscow, 117216, Russia

*Corresponding author: Olga A. Archakova. E-mail: o.archakova@cpha.ru

© Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Рогов А. В., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Шохин И. Е., 2021

© Archakova O. A., Komarov T. N., Rogov A. V., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Shohin I. E., 2021

ORCID: Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Anton V. Rogov – <https://orcid.org/0000-0001-8791-1971>; Dana S. Shchelgacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; Alexandra A. Aleshina – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 16.07.2020

Revised: 20.08.2021

Published: 25.08.2021

Abstract

Introduction. Lappaconitine is an alkaloid, contained into *Aconitum leucostomum* Vorosh. roots and herbs. The alkaloid is indicated to arrhythmia. The lappaconitine drugs are metabolized into eight pharmacologically active substances, but N-desacetylappaconitine is the most effective. Drugs based on a lappaconitine has narrow therapeutic range and many kinds of side effects. Pharmacokinetics of lappaconitine should be more studied for safety medical use of lappaconitine drugs.

Aim. The aim of this study is to develop method for the quantitative determination of lappaconitine and its active metabolite N-desacetylappaconitine in human plasma and blood by high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

Materials and methods. Determination of lappaconitine and N-desacetylappaconitine in plasma and blood was carried out by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

Conclusion. The method of the quantitative determination of lappaconitine and N-desacetylappaconitine in human plasma and blood was developed and validated by HPLC-MS/MS. The analytical range of the was 0.50–50.00 ng/ml for lappaconitine and 0.50–100.00 ng/ml for N-desacetylappaconitine in biological matrix. Method could be applied to determination of lappaconitine and N-desacetylappaconitine for PK studies.

Keywords: lappaconitine, N-desacetylappaconitine, plasma, blood, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Alexandra A. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Anton V. Rogov and Igor E. Shohin carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Archakova O. A., Komarov T. N., Rogov A. V., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Shohin I. E. Determination of lappaconitin, diterpene alkaloids obtained from plants *Aconitum leucostomum*, and its active metabolite N-desacetylappaconitin in human plasma and blood. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):105–113. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113>

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания занимают первую позицию в списке десяти ведущих причин смертности по данным ВОЗ. Болезни сердца остаются лидирующей причиной смертности во всем мире уже 20 лет. С 2000 года число случаев смерти от сердечно-сосудистых заболеваний возросло более чем на 2 миллиона и в 2019 году достигло почти 9 миллионов [1]. Не последнее место в развитии этих состояний и их последствий занимают нарушения сердечного ритма [2]. Сердечная аритмия, характеризующаяся нерегулярными циклами сердцебиения, затрагивает более 33 миллионов человек, а также ложится тяжелыми бременем на системы здравоохранения многих стран. Желудочковая аритмия является причиной около 80 % внезапных сердечных приступов. [3].

Одной из причин возникновения аритмий являются вирусные инфекции. Существует более 20 вирусов, которые участвуют в воспалении миокарда, наиболее распространенными являются парвовирус B19, вирус герпеса человека 6 типа, аденовирус и вирус Коксаки B3. Воспаление миокарда, вызванное вирусной инфекцией, приводит к дисфункции ионных каналов или электрофизиологическому и структурному ремоделированию как механизму аритмии [4]. Также есть данные о том, что новая коронавирусная инфекция SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related

coronavirus 2) играет важную роль в возникновении осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, в частности аритмии [5].

Аритмии могут приводить к другим сердечно-сосудистым заболеваниям, иногда приводя к сердечной недостаточности или внезапной смерти. Тяжелая желудочковая тахикардия или фибрилляция могут быть фатальными, и это происходит, когда сердце не может перекачивать кровь в нормальном темпе для обеспечения эффективного сердечного выброса [6].

На территории Российской Федерации в клинической практике активно применяют лаппаконитина гидробромид для лечения желудочковой и наджелудочковой экстрасистол, пароксизмальной наджелудочковой тахикардии, в том числе и при синдроме Вольфа – Паркинсона – Уайта, пароксизмах трепетания и мерцания предсердий, пароксизмальной желудочковой тахикардии в случае отсутствия органических изменений миокарда [7].

Лаппаконитин представляет собой C18-дитерпеновый алкалоид [8] семейства лютиковые (*Ranunculaceae*) [9], содержащийся в корнях и надземной части аконита белоустого (*Aconitum leucostomum*) и обладающий антиаритмическим действием [10]. После приема препаратов лаппаконитина в организме человека образуется 8 изученных фармакологически активных метаболитов, однако наибольшую активность среди них проявляет N-дезацетиллаппа-

конитин [7, 11]. Структурные формулы лаппаконитина и N-деацетиллаппаконитина представлены на рисунках 1–2.

Терапия нарушений ритма сердца с помощью антиаритмических препаратов, в частности препаратов лаппаконитина, нередко сопровождается побочными эффектами, преимущественно связанными с аритмогенным действием. Причиной могут быть большие дозы препарата, оказывающие токсическое действие

на организм человека, увеличение скорости его введения, взаимодействие с другими лекарственными средствами, заболевания печени и почек, нарушения электролитного баланса [12, 13]. Поскольку фармакокинетика препаратов лаппаконитина изучена недостаточно хорошо, то для обеспечения безопасности использования данных лекарственных средств возникает острая необходимость ее полноценного изучения [14].

На данный момент в рецензируемых журналах представлены только методики определения лаппаконитина (ЛАП) [lappaconitine (LAP)] в биологических матрицах животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием [ВЭЖХ-МС/МС (HPLC-MS/MS)] в сочетании с пробоподготовкой осаждением ацетонитрилом и жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) (таблица 1).

Поскольку в литературных источниках отсутствуют данные об определении лаппаконитина и N-деацетиллаппаконитина в биологических матрицах человека, было принято решение разработать методику определения данных веществ в плазме крови и в цельной крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

Рисунок 1. Структурная формула лаппаконитина

Figure 1. Chemical structure of lappaconitine

Рисунок 2. Структурная формула N-деацетиллаппаконитина

Figure 2. Chemical structure of N-desacetyl lappaconitine

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (класс «UHPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция), муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания), аммиак водный (класс «for analysis», PanReac, Испания), вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы лаппаконитина гидробромида (количественное содержание 100,07 %, АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), N-деацетиллаппаконитина (содержание 99,37 %, АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) и тримебутина (содержание 99,37 %, LGC, Великобритания).

Таблица 1. Методики определения лаппаконитина в биологических матрицах

Table 1. Methods of lappaconitine quantitative determination in biological matrix

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Пробоподготовка Sample preparation	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml	Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Цельная кровь мышей Mouse blood	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	Лаппаконитин: 0,100–500,000 Lappaconitine: 0.100–500.000	[15]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови кроликов Rabbit plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	Лаппаконитин: 13,125–1050,000 Lappaconitine: 13.125–1050.000	[16]

Исходные стандартные растворы лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина (ДАЛ) [N-desacetylappaconitine (DAL)] и внутреннего стандарта (ВС) тримебутина (ТРИ) [trimebutine (TRI)] готовили путем растворения навески субстанций в метаноле. Смешанные рабочие стандартные растворы лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до получения следующих концентраций в биологической матрице: 0,50 нг/мл [уровень LLOQ (lower limit of quantification)], 1,00 нг/мл, 3,00 нг/мл, 9,00 нг/мл, 15,00 нг/мл, 25,00 нг/мл, 35,00 нг/мл, 50,00 нг/мл, 1,50 нг/мл [уровень L (low)], 15,00 нг/мл [уровень M (medium)], 40 нг/мл [уровень H (high)] – для лаппаконитина; и 0,50 нг/мл (уровень LLOQ), 1,00 нг/мл, 5,00 нг/мл, 10,00 нг/мл, 25,00 нг/мл, 50,00 нг/мл, 75,00 нг/мл, 100,00 нг/мл, 1,50 нг/мл (уровень L), 30,00 нг/мл (уровень M), 80 нг/мл (уровень H) – для N-дезацетиллаппаконитина. Рабочий раствор ВС готовили путем разведения исходного раствора ВС тем же растворителем до концентрации в биологической матрице 8,00 нг/мл.

Исходные и рабочие стандартные растворы, а также образцы интактной матрицы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 200 мкл калибровочного образца, помещенного в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС тримебутина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13 500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосAMPLER хроматографа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: YMC-Pack Pro C18, 100 × 2,0 мм, 3 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему); элюент В: 0,1 % муравьиной кислоты в метаноле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему).
- Градиент по составу подвижной фазы (ПФ) представлен в таблице 2.
- Объем вводимой пробы: 6 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–7,00 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 200 °С, напряжение на капилляре +4,25 кВ.
- Режим ионизации: положительный.
- Условия детектирования лаппаконитина: 585,30 → 324,15 m/z; 585,30 → 162,15 m/z.

Таблица 2. Градиентное элюирование

Table 2. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока ПФ, мл/мин Mobil phase flow rate, ml/min
0,00	77,00	23,00	0,70
1,25	77,00	23,00	
4,00	0,00	100,00	
5,00	0,00	100,00	
5,50	77,00	23,00	
7,00	77,00	23,00	

- Условия детектирования N-дезацетиллаппаконитина: 544,25 → 120,00 m/z; 544,25 → 325,25 m/z; 543,25 → 324,10 m/z; 543,25 → 120,10 m/z.
- Условия детектирования тримебутина: 388,20 → 198,05 m/z; 388,20 → 195,10 m/z; 388,20 → 131,05 m/z.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Поскольку при разработке методик нельзя полагаться исключительно на высокую селективность масс-спектрометрического детектора, чтобы избежать получения ложноположительных результатов, были подобраны условия хроматографического разделения аналитов не только с компонентами плазмы крови, а также с компонентами цельной крови, что позволяет использовать данную методику для исследований фармакокинетики лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в различных биологических объектах. Исходя из физико-химических свойств анализируемых веществ, была выбрана хроматографическая колонка YMC-Pack Pro C18, обеспечивающая хорошее удерживание данных соединений.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики в плазме крови и в цельной крови человека проводили на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [17], а также руководств FDA [18] и EMA [19] по следующим параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность (на уровнях внутри цикла, между циклов), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов), степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов; краткосрочная стабильность («на-стоящая» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице].

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови (ИПК) [blank plasma (BP)], 2 образцов гемолитической интактной плазмы крови (ГИПК) [lipemic blank

plasma (LBP)], 2 образца гиперлипидемической интактной плазмы крови (ГЛИПК) [hemolyzed blank plasma (HBP)], полученных из разных источников, для оценки параметра «Селективность» в плазме крови человека и 6 образцов интактной цельной крови (ИЦК) [blank blood (BB)], полученных из разных источников, для оценки параметра «Селективность» в цельной крови человека, а также образцов интактной плазмы крови, интактной гемолизной плазмы крови, интактной гиперлипидемической плазмы крови и цельной крови с прибавлением смешанного рабочего стандартного раствора до концентраций 0,50 нг/мл для лаппаконитина, 0,50 нг/мл для N-дезацетиллаппаконитина и раствора ВС до концентрации 8,00 нг/мл. На хроматограммах образцов интактной матрицы сигналы пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемых веществ и ВС, не превышают 20 % от сигнала на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала ВС соответственно. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 3, 4.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и раствора ВС тримебутина без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной матрице, без учета влияния степени извлечения лаппаконитина, N-дезацетиллаппаконитина и тримебутина из биологической матрицы.

Эффект матрицы был оценен на уровнях L и H. Для ВС тримебутина эффект матрицы был рассчитан на уровне 8,00 нг/мл. Данные представлены в таблицах 3, 4.

Таблица 3. Расчет фактора матрицы ЛАП, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 3. The matrix factor of LAP calculations, normalized by the internal standards matrix factor

	Плазма крови Plasma		Цельная кровь Blood	
	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)
Среднее Average	0,93	1,16	1,14	1,15
CV, %	11,87	3,53	10,93	3,37

Калибровочная кривая

Проводили анализ восьми образцов интактной плазмы крови и восьми образцов интактной цельной крови с прибавлением рабочего раствора ВС и смешанных рабочих стандартных растворов аналитов. По полученным значениям были построены калибровоч-

Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови
Figure 3. Blank plasma sample chromatogram

Рисунок 4. Хроматограмма образца интактной цельной крови
Figure 4. Blank blood sample chromatogram

ные графики в координатах отношение площади пика лапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации лапаконитина к концентрации тримебутина, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика N-дезацетиллапаконитина к площади пика тримебутина от отношения концентрации N-дезацетиллапаконитина к концентрации тримебутина, представленные на рисунках 5–8. Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам. Примеры хроматограмм представлены на рисунках 9–12.

Таблица 4. Расчет фактора матрицы ДАЛ, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 4. The matrix factor of DAL calculations, normalized by the internal standards matrix factor

	Плазма крови Plasma		Цельная кровь Blood	
	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)
Среднее Average	0,84	1,09	0,98	1,12
CV, %	6,94	3,93	9,68	4,54

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови и цельной крови, соответствующих уровню НПКО, уровню L, уровню M и уровню H. Анализ образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность были оценены внутри цикла, между двумя циклами и между тремя циклами. Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам.

Рисунок 5. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ЛАП к площади пика ТРИ от отношения концентрации ЛАП к концентрации ТРИ в плазме крови

Figure 5. The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of LAP to the TRI on the concentration ratio of LAP to the TRI in plasma

Рисунок 6. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ЛАП к площади пика ТРИ от отношения концентрации ЛАП к концентрации ТРИ в цельной крови

Figure 6. The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of LAP to the TRI on the concentration ratio of LAP to the TRI in blood

Рисунок 7. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ДАЛ к площади пика ТРИ от отношения концентрации ДАЛ к концентрации ТРИ в плазме крови

Figure 7. The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of DAL to the TRI on the concentration ratio of DAL to the TRI in plasma

Рисунок 8. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ДАЛ к площади пика ТРИ от отношения концентрации ДАЛ к концентрации ТРИ в цельной крови

Figure 8. The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of DAL to the TRI on the concentration ratio of DAL to the TRI in blood

Рисунок 9. Хромотограмма образца плазмы крови (ЛАП – 0,50 нг/мл, ДАЛ – 0,50 нг/мл)

Figure 9. Chromatogram of plasma sample (LAP – 0.50 ng/ml, DAL – 0.50 ng/ml)

Рисунок 11. Хромотограмма образца плазмы крови (ЛАП – 50,00 нг/мл, ДАЛ – 100,00 нг/мл)

Figure 11. Chromatogram of plasma sample (LAP – 50.00 ng/ml, DAL – 100.00 ng/ml)

Рисунок 10. Хромотограмма образца цельной крови (ЛАП – 0,50 нг/мл, ДАЛ – 0,50 нг/мл)

Figure 10. Chromatogram of blood sample (LAP – 0.50 ng/ml, DAL – 0.50 ng/ml)

Рисунок 12. Хромотограмма образца цельной крови (ЛАП – 50,00 нг/мл, ДАЛ – 100,00 нг/мл)

Figure 12. Chromatogram of blood sample (LAP – 50.00 ng/ml, DAL – 100.00 ng/ml)

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы, гемолизной плазмы, гиперлипидемической плазмы и цельной крови, без влияния степени извлечения на низком (уровень L), среднем (уровень M) и высоком (уровень H) уровнях, а также образцы контроля качества, приготовленные на различных интактных матрицах, для оценки степени извлечения. Данные представлены в таблицах 5, 6.

Таблица 5. Оценка степени извлечения ЛАП на уровнях L, M, и H из различной биологической матрицы

Table 5. Calculation of LAP recovery at L, M, H levels for biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	СИ ЛАП (L), % Recovery LAP (L), %	СИ ЛАП (M), % Recovery LAP (M), %	СИ ЛАП (H), % Recovery LAP (H), %
ИПК BP	123,03	76,35	91,22
	120,71	79,49	91,42
	123,19	85,89	84,62
ГИПК HBP	130,29	95,25	120,72
	146,42	101,47	122,88
	128,52	103,06	122,88
ГЛИПК LBP	89,53	104,27	103,59
	99,30	101,86	99,76
	118,40	103,79	98,08
Среднее Average	119,93	94,60	103,91
SD	16,79	11,11	14,76
RSD	14,00	11,74	14,20
Биологическая матрица Biological matrix	СИ ЛАП (L), % Recovery LAP (L), %	СИ ЛАП (M), % Recovery LAP (M), %	СИ ЛАП (H), % Recovery LAP (H), %
ИЦК BB	90,04	122,95	99,60
	97,04	127,90	102,09
	99,78	117,41	105,74
Среднее Average	95,62	122,76	102,47
SD	5,02	5,25	3,09
RSD	5,25	4,27	3,01

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («настоящая» и «постпрепаративная»), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 20 дней при температуре -45°C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре -45°C) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочного образца с наибольшей концентрацией и образца интактной матрицы на хроматограмме образца интактной матрицы отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и ВС.

Таблица 6. Оценка степени извлечения ДАЛ на уровнях L, M, и H из различной биологической матрицы

Table 6. Calculation of DAL recovery at L, M, H levels for biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	СИ ДАЛ (L), % Recovery DAL (L), %	СИ ДАЛ (M), % Recovery DAL (M), %	СИ ДАЛ (H), % Recovery DAL (H), %
ИПК BP	124,21	86,25	101,95
	112,16	85,79	98,39
	118,16	86,13	92,13
ГИПК HBP	105,63	100,71	118,42
	115,79	98,34	129,24
	130,56	105,97	122,35
ГЛИПК LBP	97,15	104,33	105,19
	102,72	105,53	106,13
	116,17	109,69	97,97
Среднее Average	113,62	98,08	107,97
SD	10,53	9,57	12,54
RSD	9,27	9,75	11,61
Биологическая матрица Biological matrix	СИ ДАЛ (L), % Recovery DAL (L), %	СИ ДАЛ (M), % Recovery DAL (M), %	СИ ДАЛ (H), % Recovery DAL (H), %
ИЦК BB	115,63	132,83	97,71
	138,65	123,24	103,27
	105,83	118,90	109,98
Среднее Average	120,04	124,99	103,65
SD	16,85	7,13	6,14
RSD	14,04	5,71	5,93

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения лаппаконитина и N-деацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 0,50–50,00 нг/мл в биологической матрице для лаппаконитина и 0,50–100,00 нг/мл в биологической матрице для N-деацетиллаппаконитина. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований препаратов лаппаконитина.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000–2019. Available at: <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>. Accessed: 14.07.2021.
2. Sanoev Z. I., Khamroev T. T., Djaxangirov F. N., Sadikov A. Z., Sagdullaev S. S. Antiarrhythmic Activity of N-Deacetylappaconitine when Administered Orally. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(2):2339–2346.
3. Gui Yu., Lu Y., Li S., Zhang M., Duan X., Liu C. C., Jia J., Liu G. Direct analysis in real time-mass spectrometry for rapid quantification of five anti-arrhythmic drugs in human serum: application to therapeutic drug monitoring. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-72490-w.
4. Babapoor-Farrokhran S., Rasekhi R. T., Gill D., Babapoor S., Amanullah A. Arrhythmia in COVID-19. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2020;2(9):1430–1435. DOI: 10.1007/s42399-020-00454-2.
5. Kochi A. N., Tagliari A. P., Forleo G. B., Fassini G. M., Tondo C. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19.

- Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2020;31(5):1003–1008. DOI: 10.1111/jce.14479.
6. Hong B., He J., Le Q., Bai K., Chen Y., Huang W. Combination Formulation of Tetrodotoxin and Lidocaine as a Potential Therapy for Severe Arrhythmias. *Marine drugs*. 2019;17(12):685. DOI: 10.3390/md17120685.
 7. Цорин И. Б., Зинченко В. П., Теплов И. Ю., Косенков А. М., Муринов Ю. И., Юнусов М. С., Крыжановский С. А. Изучение электрофизиологических механизмов действия соединения ЛМГ-124. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;2:4–11.
 8. Sun M.-L., Ao J.-P., Wang Y.-R., Huang Q., Li T.-F., Li X.-Y., Wang Y.-X. Lappaconitine, a C18-diterpenoid alkaloid, exhibits antihypersensitivity in chronic pain through stimulation of spinal dynorphin A expression. *Psychopharmacology*. 2018;235(9):2559–2571. DOI: 10.1007/s00213-018-4948-y.
 9. Nie J., Wang F., Ji T., Zhao J., Zhao F. Assessment of in vitro cardiotoxicity of extract fractions and diterpene Alkaloids from *aconitum leucostomum* Worosch: A short communication. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;137:84–89. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.01.003.
 10. Zhang X., Ma J., Song N., Guo Y., Hui L., Sang C. Lappaconitine Sulfate Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells through the Reactive Oxygen Species-Dependent Mitochondrial Pathway. *Pharmacology*. 2020;105(11–12):705–714. DOI: 10.1159/000506081.
 11. Долгинина С. И., Дупляков Д. В. Место аллапинина в терапии нарушений сердечного ритма. *Кардиология: новости, мнения, обсуждения*. 2016;2:25–29.
 12. Рудакова И. П., Гашкова О. В. Оценка антиаритмической активности и безопасности новых производных морфолиноуксусной кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2(19):242–245.
 13. Cheremnykh K. P., Savel'ev V. A., Shkurko O. P., Shults E. E. Synthesis of hybrid molecules containing pyrimidine and diterpene alkaloid lappaconitine fragments. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2018;54(12):1131–1138. DOI: 10.1007/s10593-019-02404-w.
 14. Yang S., Zhang H., Beier R. C., Sun F., Cao X., Shen J., Wang Z., Zhang S. Comparative metabolism of Lappaconitine in rat and human liver microsomes and in vivo of rat using ultra high-performance liquid chromatography–quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;110:1–11. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.048.
 15. Chen F., Shen X., Huang P., Fu H., Jin Yu., Wen C. Quantification of Lappaconitine in Mouse Blood by UPLC-MS/MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *BioMed Research International*. 2019;2019:1–6. DOI: 10.1155/2019/6262105.
 16. Wang Y., Han Ch., He K., Feng A. Quantitative determination of lappaconitine in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in the pharmacokinetic study in rabbits. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;7(12):650–657. DOI: 10.5897/AJPP12.1301.
 17. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 14.07.2021.
 18. Guidance document "Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry". *Food and Drug Administration*. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 14.07.2021.
 19. Bioanalytical method validation. *European Medicines Agency*. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 14.07.2021.
 - therapeutic drug monitoring. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-72490-w.
 4. Babapoor-Farrokhran S., Rasekhi R. T., Gill D., Babapoor S., Amanullah A. Arrhythmia in COVID-19. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2020;2(9):1430–1435. DOI: 10.1007/s42399-020-00454-2.
 5. Kochi A. N., Tagliari A. P., Forleo G. B., Fassini G. M., Tondo C. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2020;31(5):1003–1008. DOI: 10.1111/jce.14479.
 6. Hong B., He J., Le Q., Bai K., Chen Y., Huang W. Combination Formulation of Tetrodotoxin and Lidocaine as a Potential Therapy for Severe Arrhythmias. *Marine drugs*. 2019;17(12):685. DOI: 10.3390/md17120685.
 7. Tsorin I. B., Zinchenko V. P., Teplov I. Yu., Kosenkov A. M., Murinov Yu. I., Yunusov M. S., Kryzhanovskii S. A. The study of electrophysiological mechanisms of the action compounds LMG-124. *Farmakokinetika i Farmakodinamika = Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;2:4–11. (In Russ.)
 8. Sun M.-L., Ao J.-P., Wang Y.-R., Huang Q., Li T.-F., Li X.-Y., Wang Y.-X. Lappaconitine, a C18-diterpenoid alkaloid, exhibits antihypersensitivity in chronic pain through stimulation of spinal dynorphin A expression. *Psychopharmacology*. 2018;235(9):2559–2571. DOI: 10.1007/s00213-018-4948-y.
 9. Nie J., Wang F., Ji T., Zhao J., Zhao F. Assessment of in vitro cardiotoxicity of extract fractions and diterpene Alkaloids from *aconitum leucostomum* Worosch: A short communication. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;137:84–89. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.01.003.
 10. Zhang X., Ma J., Song N., Guo Y., Hui L., Sang C. Lappaconitine Sulfate Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells through the Reactive Oxygen Species-Dependent Mitochondrial Pathway. *Pharmacology*. 2020;105(11–12):705–714. DOI: 10.1159/000506081.
 11. Dolginina S. I., Duplyakov D. V. Allapinin's place in cardiac arrhythmia therapy. *Kardiologiya: novosti, mneniya, obsuzhdeniya = Cardiology: news, views, education*. 2016;2:25–29. (In Russ.)
 12. Rudakova I. P., Gashkova O. V. Assessment of antiarrhythmic activity and safety of new derivatives of morpholinoacetic acid. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2(19):242–245. (In Russ.)
 13. Cheremnykh K. P., Savel'ev V. A., Shkurko O. P., Shults E. E. Synthesis of hybrid molecules containing pyrimidine and diterpene alkaloid lappaconitine fragments. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2018;54(12):1131–1138. DOI: 10.1007/s10593-019-02404-w.
 14. Yang S., Zhang H., Beier R. C., Sun F., Cao X., Shen J., Wang Z., Zhang S. Comparative metabolism of Lappaconitine in rat and human liver microsomes and in vivo of rat using ultra high-performance liquid chromatography–quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;110:1–11. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.048.
 15. Chen F., Shen X., Huang P., Fu H., Jin Yu., Wen C. Quantification of Lappaconitine in Mouse Blood by UPLC-MS/MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *BioMed Research International*. 2019;2019:1–6. DOI: 10.1155/2019/6262105.
 16. Wang Y., Han Ch., He K., Feng A. Quantitative determination of lappaconitine in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in the pharmacokinetic study in rabbits. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;7(12):650–657. DOI: 10.5897/AJPP12.1301.
 17. Reshenie Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 03.11.2016 g. № 85 "Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza" [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of 03.11.2016 No. 85 "On approval of the Rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union"]. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Accessed: 14.07.2021. (In Russ.)
 18. Guidance document "Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry". *Food and Drug Administration*. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 14.07.2021.
 19. Bioanalytical method validation. *European Medicines Agency*. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 14.07.2021.

REFERENCES

1. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000–2019. Available at: <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>. Accessed: 14.07.2021.
2. Sanoev Z. I., Khamroev T. T., Djaxangirov F. N., Sadikov A. Z., Sagdullaev S. S. Antiarrhythmic Activity of N-Deacetyl lappaconitine when Administered Orally. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(2):2339–2346.
3. Gui Yu., Lu Y., Li S., Zhang M., Duan X., Liu C. C., Jia J., Liu G. Direct analysis in real time-mass spectrometry for rapid quantification of five anti-arrhythmic drugs in human serum: application to