https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189
УДК 615.03

Check for updates
CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

П. К. Карнакова[1,2]*, Т. Н. Комаров[1,3], О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], А. В. Алешина[1], Н. С. Багаева[1], П. А. Карпова[1,2], И. Е. Шохин[1,3]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
[2] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[3] ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

***Контактное лицо:** Карнакова Полина К. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

ORCID: П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; 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; П. А. Карпова – https://orcid.org/0000-0001-6777-5976; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 11.10.2021 **Статья принята в печать:** 15.11.2021 **Статья опубликована:** 25.11.2021

Резюме

Введение. Наибольшей эффективностью и безопасностью в лечении артериальной гипертензии обладают комбинированные лекарственные препараты. Комбинация кандесартана и гидрохлоротиазида (антагонист рецепторов AT_1 и тиазидный диуретик соответственно) обеспечивает высокую эффективность антигипертензивной комбинированной терапии и находит широкое применение в медицинской практике. Разработка методики совместного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека является необходимой процедурой для выполнения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшего исследования биоэквивалентности.

Материалы и методы. Определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом. Внутренний стандарт: смешанный раствор валсартана и индапамида. Подвижная фаза: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А), 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Колонка: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм, 5 мкм. Аналитические диапазоны методики: 2,00–300,00 нг/мл для кандесартана, 2,00–200,00 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме крови. Источник ионизации: электроспрей. Условия детектирования: 441,10 → 192,00 m/z, 441,10 → 263,15 m/z (кандесартан), 295,85 → 269,00 m/z (гидрохлоротиазид), 436,00 → 207,05 m/z (валсартан), 363,85 → 132,10 m/z, 363,85 → 189,00 m/z (индапамид).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и внутренних стандартов; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналитов; долгосрочная стабильность аналитов в матрице). Разработанная и валидированная методика соответствует требованиям правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза.

Заключение. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 2,00–300,00 нг/мл для кандесартана и 2,00–200,00 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения исследования биоэквивалентности комбинированных препаратов кандесартана и гидрохлоротиазида.

Ключевые слова: кандесартан, гидрохлоротиазид, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, определение, фармакокинетика, биоэквивалентность

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, П. К. Карнакова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. П. А. Карпова занималась подготовкой проб к анализу. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Карпова П. А., Шохин И. Е. Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):177–189. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189

Simultaneous Determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Polina K. Karnakova[1,2]*, Timofey N. Komarov[1,3], Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Alexandra A. Aleshina[1], Natalia S. Bagaeva[1], Polina A. Karpova[1,2], Igor E. Shohin[1,3]

[1] LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[2] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[3] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

***Corresponding author:** Polina K. Karnakova. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

© Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Карпова П. А., Шохин И. Е., 2021
© Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Karpova P. A., Shohin I. E., 2021

ORCID: Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; 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; Polina A. Karpova – https://orcid.org/0000-0001-6777-5976; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 11.10.2021 **Revised:** 15.11.2021 **Published:** 25.11.2021

Abstract

Introduction. Combined drugs have the greatest efficacy and safety in arterial hypertension treatment. The combination of candesartan and hydrochlorothiazide (AT_1-receptor antagonist and a thiazide diuretic, respectively) provides high efficiency of antihypertensive combination therapy, therefore it is widely used in medical practice. Developing a method for simultaneous determination of candesartan and hydrochlorithiazide in human blood plasma is necessary for performing the analytical part of pharmacokinetic studies and bioequivalence studies of multicomponent drugs.

Aim. The aim of this study is to develop a method for quantitative determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for further bioequivalence studies.

Materials and methods. Determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation. Internal standard: mixed solution of valsartan and indapamide. Mobile phase: 0.1 % formic acid solution in water (eluent A), 0.1 % formic acid in acetonitrile (eluent B). Column: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50x4.6 mm, 5 µm. Analytical range: 2.00–300.00 ng/mL for candesartan, 2.00–200.00 ng/mL for hydrochlorothiazide in human plasma. Ionization source: electrospray ionization. Detection conditions: 441.10 → 192.00 m/z, 441.10 → 263.15 m/z (candesartan), 295.85 → 269.00 m/z (hydrochlorothiazide), 436.00 → 207.05 m/z (valsartan), 363.85 → 132.10, 363.85 → 189.00 m/z (indapamide).

Results and discussion. This method was validated by selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability. The developed method meets the requirements for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union.

Conclusion. The analytical range was 2.00–300.00 ng/mL for candesartan, 2.00–200.00 ng/mL for hydrochlorothiazide in human plasma. The method was applied in BE study of the combination of candesartan and hydrochlorothiazide.

Keywords: candesartan, hydrochlorothiazide, 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, Polina K. Karnakova have developed and validated the analytical method. Polina A. Karpova was involved in sample preparation. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. 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: Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Karpova P. A., Shohin I. E. Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC-MS/MS. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):177–189. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день артериальная гипертензия (АГ) – наиболее часто встречаемое заболевание сердечно-сосудистой системы. По данным ВОЗ за 2000–2019 гг. сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают лидирующую позицию в списке десяти ведущих причин смертности [1]; 54 % инсультов и 47 % случаев ишемической болезни сердца являются прямым следствием артериальной гипертензии [2]. Таким образом, артериальная гипертензия считается одним из основных факторов риска возникновения таких осложнений ССЗ, как сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и инсульт, что часто приводит к инвалидности и смерти [2, 3]. В последнее время эффективная терапия артериальной гипертензии во многом помогла снизить риски возникновения инсультов [4]. Тем не менее наблюдается тенденция роста случаев возникновения артериальной гипертензии среди населения, и к 2025 году прогнозируется 1,56 млрд пациентов с данным заболеванием [5].

В руководстве ESC/ESH 2018 [European Society of Cardiology/European Society of Hypertension (Европейская ассоциация кардиологов/Европейское общество по лечению артериальной гипертензии)] кандесартан в комбинации с гидрохлоротиазидом были отнесены к препаратам первой линии для лечения артериальной гипертензии. По данным многочисленных клинических исследований можно сделать вывод о том, что снижение артериального давления (АД) при использовании данной комбинации значительнее, чем при монотерапии любым из этих препаратов и по сравнению с другими антигипертензивными препаратами, относящимися к той же терапевтической группе. Кроме того, эта комбинация показала хорошую переносимость и небольшое количество побочных реакций; также прием кандесартана и гидрохлоротиазида эффективно снижает уровень АД даже после пропущенной дозы [6]. Были отмечены их нейтральный метаболический профиль, органопротективное действие и возможность использования у

пациентов с хронической болезнью почек, хронической сердечной недостаточностью, инсультом в анамнезе [7–13].

Таким образом, разработка комбинированных лекарственных препаратов кандесартана и гидрохлоротиазида является важным и перспективным направлением.

Кандесартан (2-этокси-1-({4-[2-(2H-1,2,3,4-тетразол-5-ил)фенил]фенил}метил)-1H-1,3-бензодиазол-6-карбоновая кислота) – антигипертензивное средство, оказывающее дозозависимое длительное снижение АД и общего периферического сопротивления сосудов без изменения частоты сердечных сокращений. Является непептидным блокатором рецепторов ангиотензина II (БРА), избирательно связывающимся с рецептором ангиотензина II подтипа 1 (AT_1); не обладает активностью в отношении подтипа рецептора AT_2, что характеризует его высокоселективную блокаду ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС). В результате блокирования рецепторов AT_1 происходит дозозависимое повышение активности ренина, ангиотензина I, ангиотензина II и снижение концентрации альдостерона в плазме крови. Высокая тропность к AT_1-рецепторам, медленная диссоциация из связи с ними и повторное связывание объясняют, почему этот лекарственный препарат обладает более выраженным и длительным антигипертензивным действием, чем другие блокаторы рецепторов ангиотензина, и обеспечивает сохранение антигипертензивного эффекта даже при пропущенном приеме очередной дозы. Кандесартан хорошо переносится пациентами с гипертонией. Нежелательные явления не связаны с дозой и в основном имеют легкую или умеренную степень тяжести [14, 15].

Гидрохлоротиазид (6-хлор-3,4-дигидро-2H-1,2,4-бензотиадиазин-7-сульфонамид-1,1-диоксид) – это тиазидный диуретик. Действует на дистальные канальцы почек и снижает реабсорбцию ионов натрия и хлора, а также угнетает чувствительность стенок сосудов к сосудосуживающему влиянию различных медиаторов. Вследствие этого, а также за счет снижения объема циркулирующей крови препарат оказывает диуретическое действие и нормализует кровяное давление [16, 17]. Несмотря на то, что гидрохлоротиазид остается препаратом выбора при АГ, его эффективное применение в качестве монотерапии может быть ограничено различными факторами, в основном связанными с межиндивидуальной вариабельностью [14]. Применение гидрохлоротиазида вместе с препаратами из группы БРА за счет аддитивного влияния на патогенетические механизмы АГ обеспечивает высокую эффективность комбинированной терапии [18, 19].

Разработка и валидация методики совместного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств [20].

В настоящее время опубликован ряд исследований по определению кандесартана и гидрохлоротиазида в биологических жидкостях с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения данных веществ применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV)], флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) [high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)].

В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки используется способ жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), а в некоторых случаях способ осаждения белков метанолом (MeOH) или ацетонитрилом (ACN), твердофазная экстракция (ТФЭ) (таблица 1).

Проанализировав литературные данные по разработке методик определения кандесартана и гидрохлоротиазида, было сделано заключение об отсутствии опубликованных методик совместного определения данных веществ одновременно с достаточной чувствительностью и простым способом пробоподготовки, поэтому было принято решение разработать и валидировать такую методику самостоятельно.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков ацетонитрилом.

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 тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройным квадруполем) (Shimadzu Corporation, Япония). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды); ацетонитрил (класс «Ultra Gradient HPLC-grade», J.T. Baker, Ни-

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения кандесартана и гидрохлоротиазида

Table 1. Bioanalytical methods of candesartan and hydrochlorothiazide quantitative determination

Аналитический метод (источник ионизации; ионизация (+/–), если применимо) Analytical method (ionization source; ionization (+/–) if applicable)	Объект анализа Object	Пробоподготовка Sample preparation	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/mL		Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	1,027–302,047	[21]
			ГХТ HCTZ	1,044–306,945	
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) UPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	1,00–499,15	[22]
			ГХТ HCTZ	1,00–499,15	
ВЭЖХ-УФ HPLC–UV	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ACN Protein precipitation by acetonitrile	КАН CAN	30,00–2500,00	[23]
			ГХТ HCTZ	20,00–100,00	
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	1,00–160,00	[24]
			ГХТ HCTZ	2,00–160,00	
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ACN Protein precipitation by acetonitrile	КАН CAN	3,125–200,000	[25]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	20,00–200,00	[26]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; +) PLC-MS/MS (electrospray; +)	Плазма крови человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	КАН CAN	1,00–400,00	[27]
ВЭЖХ-УФ HPLC–UV	Плазма крови человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	ГХТ HCTZ	10,00–900,00	[28]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение MeOH Protein precipitation by methanol	ГХТ HCTZ	0,78–200,00	[29]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Моча и плазма крови человека Human plasma and urine	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	ГХТ HCTZ	Плазма: 1,00–100,00 Моча: 0,05–20,00 Plasma: 1.00–100.00 Urine: 0.05–20.00	[30]

дерланды; ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «ТД «ХИММЕД», Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания); вода очищенная Milli-Q.

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы стандартные образцы кандесартана (USP reference standard, Китай, содержание 100,0 %), гидрохлоротиазида (Unichem Laboratories Limited, Индия, содержание 99,6 %), валсартана (USP reference standard, Швейцария, содержание 99,8 %) и индапамида (USP reference standard, Испания, содержание 99,7 %).

Исходные стандартные растворы кандесартана, гидрохлоротиазида и внутренних стандартов (ВС) валсартана и индапамида готовили путем растворения навески субстанции в ацетонитриле.

Смешанные рабочие стандартные растворы кандесартана, гидрохлоротиазида и смешанный рабочий раствор ВС готовили путем разведения исходных стандартных растворов тем же растворителем до получения в биологической матрице концентраций, соответствующих уровням 1–8, нижнему пределу количественного определения (НПКО) [Lower limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], средним [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2).

Образцы интактной плазмы, исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °C.

Пробоподготовка

К 200 мкл образца (калибровочного образца, образца контроля качества и образца интактной плазмы крови), помещенным в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл смешанного рабочего раствора ВС, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин с ускорением 15 000 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. **Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и образцах контроля качества**

Table 2. **Concentrations of analytes at calibration levels and quality control samples**

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml		Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml	
	КАН CAN	ГХТ HCTZ	ВАЛ VAL	ИНД IND
1	2,00	2,00	100,00	100,00
2	15,00	15,00	100,00	100,00
3	50,00	25,00	100,00	100,00
4	100,00	50,00	100,00	100,00
5	150,00	75,00	100,00	100,00
6	200,00	100,00	100,00	100,00
7	250,00	150,00	100,00	100,00
8	300,00	200,00	100,00	100,00
LLOQ	2,00	2,00	100,00	100,00
L	6,00	6,00	100,00	100,00
M1	90,00	60,00	100,00	100,00
M2	180,00	120,00	100,00	100,00

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges C18 4 × 3,0 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: *элюент А*: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (по объёму); *элюент В*: 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).
- Скорость потока подвижной фазы (ПФ) – 1,0 мл/мин.
- Градиент по составу ПФ представлен в таблице 3.

Таблица 3. **Градиентное элюирование**

Table 3. **Gradient elution**

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %
0,00	90,00	10,00
1,00	90,00	10,00
3,50	0,00	100,00
4,50	0,00	100,00
4,70	90,00	10,00
6,50	90,00	10,00

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–6,50 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °C, линия десольватации 200 °C.
- Напряжение на капилляре, режим ионизации и условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. **Параметры источника ионизации и условия детектирования**

Table 4. **Ion-source parameters and detection conditions**

	Напряжение на капилляре Capillary voltage	Режим ионизации Ion mode	Условия детектирования Detection conditions
КАН CAN	3,0	+	441,10 → 192,00 m/z, 441,10 → 263,15 m/z
ГХТ HCTZ	4,5	–	295,85 → 269,00 m/z
ВАЛ VAL	3,0	+	436,00 → 207,05 m/z
ИНД IND	5,0	–	363,85 → 132,10, 363,85 → 189,00 m/z

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В качестве внутренних стандартов (ВС) были подобраны вещества, похожие на анализируемые вещества по структуре и физико-химическим свойствам (таблица 5). ВС для кандесартана был выбран валсартан ((S)-N-(1-карбокси-2-метилпроп-1-ил)-N-пентаноил-N-[2-(1H-тетразол-5-ил)бифенил-4-ил-метил] амин), для гидрохлоротиазида – индапамид (3-(аминосульфонил)-4-хлор-N-(2,3-дигидро-2-метил-1H-индол-1-ил)бензамид).

Таблица 5. **Физико-химические свойства анализируемых веществ и внутренних стандартов**

Table 5. **Physicochemical properties of the analytes and internal standards**

	Молекулярная масса, г/моль Molecular mass, g/mol	pKa	logP	Ссылка Referance
КАН CAN	440,5	4,23	6,12	[31]
ВАЛ VAL	435,5	4,37	5,27	[32]
ГХТ HCTZ	297,7	9,09	–0,58	[33]
ИНД IND	365,8	8,85	2,64	[34]

Использовались условия масс-спектрометрического детектирования, позволяющие получить пики аналитов и ВС с наибольшей интенсивностью. Во время разработки методики были проанализированы фрагменты, получаемые при разных энергиях соударения.

Было отмечено, что гидрохлоротиазид и индапамид в режиме отрицательной ионизации образуют аддукты с остатками трифторуксусной кислоты (ТФУ). Учитывая это, для анализа требовалось создавать избыток ТФУ в системе, что негативно влияло на ионизацию кандесартана и валсартана, поэтому были подобраны оптимальные значения напряжений на линии десольватации, обеспечивающие разрушение образующихся аддуктов, что позволяло проводить анализ по исходным молекулярным ионам.

В качестве осадителя был выбран ацетонитрил, так как его использование обеспечивало наиболее полное осаждение белков плазмы крови и оптимальную форму хроматографических пиков.

В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств определяемых веществ, были рассмотрены несколько колонок для хроматографического разделения данной комбинации веществ, в том числе: Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18, 2,7 мкм, 3,0 × 100 мм; Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl, 2,7 мкм, 2,1 × 50 мм; Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 5 мкм, 50 × 4,6 мм. После сравнения хроматографических характеристик данных колонок (таблица 6) в качестве окончательного варианта была выбрана колонка Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl.

Таблица 6. Хроматографические характеристики

Table 6. Characteristics of chromatography

Характеристика Characteristic	Вещество Substance	Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18	Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl
Приведенное время удерживания Relative retention time	ГХТ HCTZ	0,082	1,196	1,585
	ИНД IND	2,054	–*	2,181
	ВАЛ VAL	2,365	–*	2,326
	КАН CAN	2,939	2,731	2,800
Фактор асимметрии Tailing factor	ГХТ HCTZ	1,191	0,725	1,239
	ИНД IND	1,344	–*	1,148
	ВАЛ VAL	1,320	–*	1,509
	КАН CAN	1,015	1,218	1,076
Ширина Width	ГХТ HCTZ	0,288	0,528	0,137
	ИНД IND	0,142	–*	0,108
	ВАЛ VAL	0,149	–*	0,096
	КАН CAN	0,193	0,087	0,142

Примечание. * Подбор условий хроматографического разделения валсартана и индапамида с использованием колонки Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl не производился, поскольку были получены неудовлетворительные характеристики хроматографического разделения кандасартана и гидрохлоротиазида.

Note. * We did not adjust the conditions for chromatographic separations of valsartan and indapamide using the Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl column was not performed because the chromatographic separation of candasartan and hydrochlorothiazide was not satisfactory.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики совместного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека проводили на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [20], а также руководств FDA [35] и EMA [36] 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 и предел обнаружения, перенос пробы, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и ВС; краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналитов; долгосрочная стабильность аналитов в матрице].

Селективность

Для оценки данного параметра проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови: 2 образцов интактной плазмы с повышенным содержанием липидов и 2 образцов гемолизной интактной плазмы, полученных из разных источников, а также образцов с прибавлением смешанных рабочих стандартных растворов до концентраций анализируемых веществ и ВС, соответствующих уровню 1 (см. таблицу 2).

На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемых веществ и ВС или их сигнал не превышает 20 % от сигнала на уровне НПКО и 5 % от сигнала ВС соответственно. Хроматограмма образца интактной плазмы крови приведена на рисунке 1.

Эффект матрицы

Для оценки влияния биологической матрицы на количественное определение кандесартана в комбинации с гидрохлоротиазидом были проанализированы образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов кандесартана и гидрохлоротиазида и смешанного рабочего раствора ВС без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени извлечения анализируемых веществ и ВС из биологической матрицы.

Эффект матрицы был оценен на уровнях L и H аналитических диапазонов концентраций кандесартана и гидрохлоротиазида (см. таблицу 2). Для ВС валсартана и индапамида эффект матрицы был рассчитан на уровне 100,00 нг/мл. Данные представлены в таблице 7.

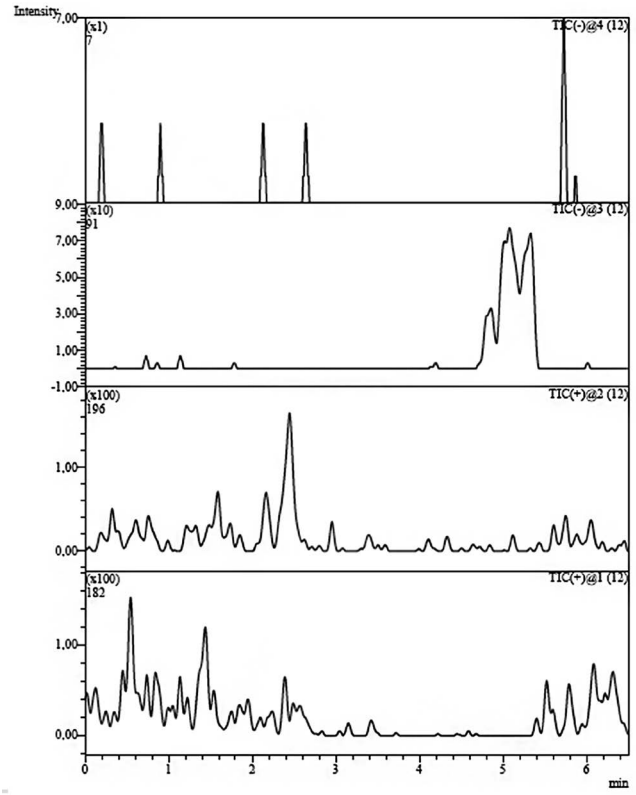

Рисунок 1. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 1. **Blank plasma sample chromatogram**

Таблица 7. **Расчет фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта**

Table 7. **Calculation of the matrix factor of the analyzed substances, normalized by the matrix factor of internal standards**

	Плазма крови Blank plasma		Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma		Гиперлипидемическая плазма Lipemic blank plasma	
	Нормализованный Mf Normalized Mf					
	L	H	L	H	L	H
Кандесартан Candesartan						
Среднее Average	1,00	0,90	1,00	0,90	0,97	0,91
CV, %	7,28	2,84	6,20	5,42	7,45	2,89
Гидрохлоротиазид Hydrochlorothiazide						
Среднее Average	0,79	0,83	0,65	0,76	0,73	0,89
CV, %	14,22	8,43	14,28	6,64	12,96	4,49

По полученным данным был рассчитан фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту. Коэффициент вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, не превышает 15 % и соответствует требованиям нормативной документации.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с прибавлением смешанного рабочего раствора ВС и смешанных рабочих стандартных растворов кандесартана и гидрохлоротиазида до получения концентраций анализируемых веществ и внутренних стандартов, соответствующих уровням 1–8 (см. таблицу 2).

По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика кандесартана к площади пика валсартана от отношения концентрации кандесартана к концентрации валсартана в плазме крови, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика гидрохлоротиазида к площади пика индапамида от отношения концентрации гидрохлоротиазида к концентрации индапамида в плазме крови.

Уравнения калибровочных графиков имели следующий вид: $f(x) = a \times x + b$. Значения переменных и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–3 приведены в таблице 8. Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам. Примеры хроматограмм приведены на рисунках 2, 3.

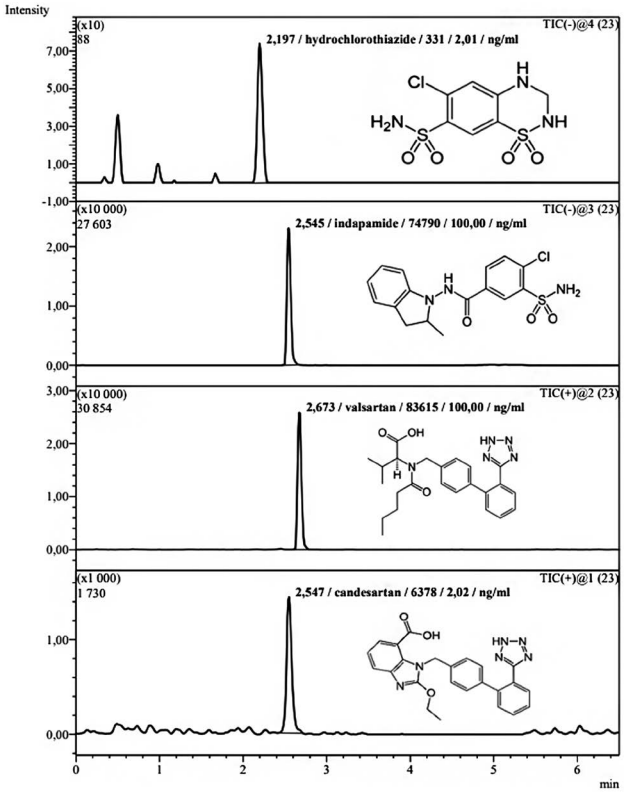

Рисунок 2. **Хроматограмма образца плазмы крови (КАН 2,00 нг/мл, ГХТ 2,00 нг/мл)**

Figure 2. **Chromatogram of plasma sample (CAN 2.00 ng/ml, HCTZ 2.00 ng/ml)**

Таблица 8. **Значения переменных и коэффициенты корреляции**

Table 8. **Variable values and correlation coefficients**

№	a	b	R	a	b	R
	КАН CAN			ГХТ HCTZ		
1	3,45720	0,00629339	0,9973444	0,345995	0,00251571	0,9963785
2	3,02578	0,01029410	0,9983502	0,400132	0,00227891	0,9955384
3	2,94655	0,00336622	0,9977839	0,390876	0,00096891	0,9969791

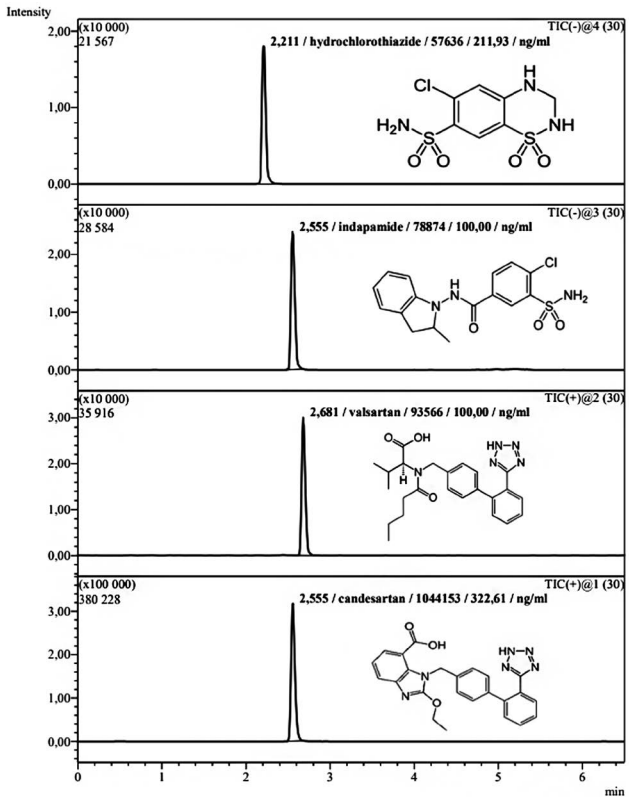

Рисунок 3. **Хроматограмма образца плазмы крови (КАН 300,00 нг/мл, ГХТ 200,00 нг/мл)**

Figure 3. **Chromatogram of blood sample (CAN 300.00 ng/ml, HCTZ 200.00 ng/ml)**

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 2). Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 вводов образца для каждого уровня концентраций кандесартана и гидрохлоротиазида.

Оценка параметра оценивалась внутри цикла, между двумя и между тремя циклами. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Данные соответствуют нормам (таблица 9).

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы, гемолизной плазмы, гиперлипидемической плазмы без влияния степени извлечения на низком (уровень L), средних (уровень M1, уровень M2) и высоком (уровень H) уровнях, а также образцы контроля качества, приготовленные на различных интактных матрицах, для оценки степени извлечения. Данные представлены в таблице 10. RSD рассчитанных значений степени извлечения аналитов из биологических матриц не превышает 15 %.

Таблица 9. **Точность и прецизионность методики определения кандесартана и гидрохлоротиазида (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)**

Table 9. **Accuracy and precision of candesartan and hydrochlorothiazide determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)**

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	RSD, %			E, %		
	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)
Кандесартан *Candesartan*						
2,00	7,68	7,99	8,47	–9,60	–10,80	–9,13
6,00	4,39	4,81	4,86	–5,80	–8,77	–9,10
90,00	3,27	4,80	4,24	4,40	7,91	8,87
180,00	3,88	3,69	3,01	6,86	7,63	7,62
240,00	3,30	3,69	3,70	7,27	8,09	9,14
Гидрохлоротиазид *Hydrochlorothiazide*						
2,00	4,55	14,14	12,91	10,10	–2,35	0,50
6,00	7,31	10,16	9,68	2,83	–0,27	2,96
60,00	3,09	4,52	4,75	7,80	6,02	8,14
120,00	1,87	5,17	5,19	5,76	2,16	3,34
160,00	6,03	4,33	5,20	1,50	1,65	4,13

Нижний предел количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. За НПКО методики принимались минимальные концентрации кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови в соответствующих аналитических диапазонах, для которых возможно количественное определение кандесартана и гидрохлоротиазида со значениями RSD и E не более 20 %. Нижние пределы количественного определения методики составили 2,00 нг/мл для кандесартана и 2,00 нг/мл для гидрохлоротиазида.

Хроматограмма плазмы крови с содержанием кандесартана и гидрохлоротиазида на уровне НПКО приведена на рисунке 2.

Таблица 10. Оценка степени извлечения кандесартана и гидрохлоротиазида на уровнях L, M1, M2 и H из различных биологических матриц

Table 10. Calculation of candesartan and hydrochlorothiazide recovery at L, M1, M2, H levels from the different biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	СИ КАН. % Recovery CAN, %				СИ ГХТ, % Recovery HCTZ, %			
	L	M1	M2	H	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	111,62	106,60	97,73	103,62	100,60	104,56	106,05	101,83
	107,76	95,28	93,15	106,80	107,94	110,22	95,88	119,57
	112,48	93,90	102,06	103,06	98,08	100,30	100,35	105,52
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	88,89	80,14	93,58	93,52	88,64	81,55	100,91	88,70
	94,92	78,61	96,16	88,33	67,33	90,44	100,36	104,61
	94,87	80,57	94,86	86,46	71,96	91,53	106,72	101,79
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	87,09	89,20	93,06	84,74	98,17	106,17	95,95	100,64
	93,76	92,47	96,28	89,90	61,64	98,23	104,37	95,28
	95,87	92,14	91,80	88,82	85,58	97,49	97,17	91,68
Среднее Average	94,45				96,61			
SD	8,22				11,71			
RSD	8,70				12,12			

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 60 дней при температуре –45 °С), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре –45 °С) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций (см. таблицу 2). Данные приведены в таблице 11. Для полученных значений концентраций анализируемых веществ была рассчитана относительная погрешность Е, %. Полученные величины относительной погрешности соответствуют нормам.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов с наибольшей концентрацией и образцов интактной плазмы крови на хроматограммах образцов интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и ВС.

Таблица 11. Оценка стабильности

Table 11. Stability assessment

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Среднее значение Е, % Average value of E, %			
		КАН CAN		ГХТ HCTZ	
		L	H	L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °С Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	–11,44	–14,74	11,89	7,24
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	29 часов при температуре 4 °С 29 hours at 4 °C	–11,44	13,75	–10,56	5,56
Стабильность при техкратной заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	42 часа при температуре –42,5 ± 7,5 °С и 9 часов при температуре 20 ± 5 °С 42 hours at –42.5 ± 7.5 °C and 9 hours at 20 ± 5 °C	–11,33	10,28	11,17	9,16
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	80 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °С 80 days at –42.5 ± 7.5 °C	13,75	13,75	11,17	10,98
Стабильность исходных стандартных растворов Stock solution stability	80 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °С 80 days at –42.5 ± 7.5 °C	–11,22	–8,58	11,78	8,32
Стабильность рабочих стандартных растворов Work solution stability	80 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °С 80 days at –42.5 ± 7.5 °C	–7,94	11,40	0,00	7,00

Применение разработанной методики

Был проведен аналитический этап исследования биоэквивалентности воспроизведенного комбинированного препарата кандесартана – гидрохлоротиазида и препарата сравнения. На рисунке 4 приведен пример хроматограммы образца плазмы крови добровольца, принимавшего участие в данном исследовании.

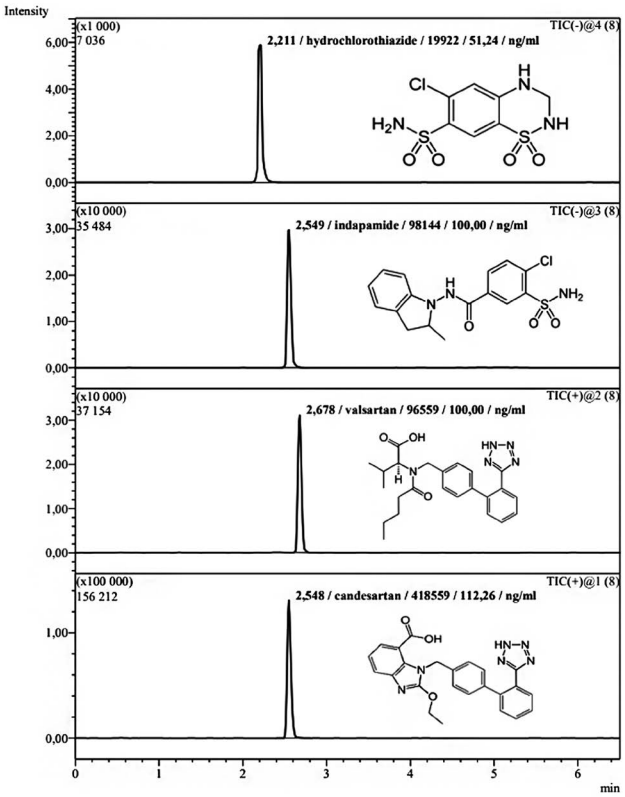

Рисунок 4. **Хроматограмма плазмы крови добровольца**

Figure 4. **Chromatogram of volunteer plasma sample**

Индивидуальные профили изменения значений концентраций кандесартана (гидрохлоротиазида) в плазме крови человека во времени (*t*), зарегистрированные после приема исследуемого препарата и препарата сравнения, характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t*, выше нПКО (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций, площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$).

В таблице 12 приведены значения среднего арифметического и среднего геометрического для кандесартана и гидрохлоротиазида.

Фармакокинетические профили исследуемого препарата и препарата сравнения приведены на рисунках 5, 6.

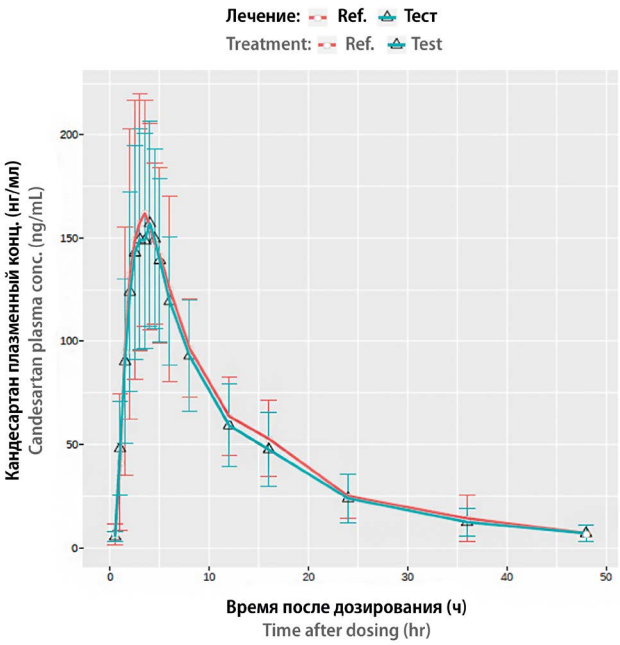

Рисунок 5. **Усредненные фармакокинетические профили кандесартана (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями). Исследуемый препарат (T), препарат сравнения (R)**

Figure 5. **Average pharmacokinetic profiles of candesartan (in linear transformation with standard deviations). Test drug product (T), Reference drug product (R)**

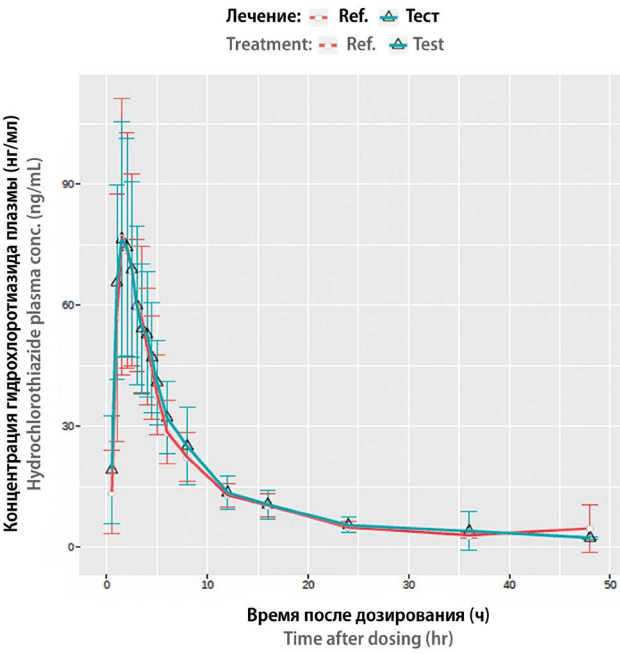

Рисунок 6. **Усредненные фармакокинетические профили гидрохлоротиазида (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями). Исследуемый препарат (T), препарат сравнения (R)**

Figure 6. **Averaged pharmacokinetic profiles of hydrochlorothiazide (in linear transformation, with standard deviations). Test drug product (T), Reference drug product (R)**

Таблица 12. Значения средних арифметических и средних геометрических параметров для кандесартана и гидрохлоротиазида

Table 12. Arithmetic means and geometric means values of candesartan and hydrochlorothiazide

Параметры Parameters	Mean (GMean)			
	КАН CAN		ГХТ HCTZ	
	T	R	T	R
C_{max}, нг/мл	174,15 (164,97)	185,16 (174,88)	85,29 (81,36)	83,64 (77,97)
AUC_{0-t}, нг · ч/мл	1983,31 (1891,48)	2098,79 (2033,68)	597,85 (577,39)	561,33 (544,42)
$AUC_{0-\infty}$, нг · ч/мл	2094,31 (1992,83)	2211,58 (2134,72)	645,39 (622,97)	606,44 (590,35)

Примечание. Mean – среднее арифметическое; GMean – среднее геометрическое. Исследуемый препарат (T), препарат сравнения (R).

Note. Mean – arithmetic mean; GMean – geometric mean. Study drug (T), comparison drug (R).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 2,00–300,00 нг/мл для кандесартана и 2,00–200,00 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения исследования биоэквивалентности комбинированных препаратов кандесартана и гидрохлоротиазида.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ публикует статистику о ведущих причинах смертности и инвалидности во всем мире за период 2000–2019 гг. Доступно по: https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019. Ссылка активна на 18.10.2021.
2. Jordan J., Kurschat C., Reuter H. Arterial hypertension–diagnosis and treatment. *Deutsches* Ärzteblatt *International.* 2018;115:557–568. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0557.
3. Marushchak A., Rogovyy Y., Doroshko V., Shvets V., Savchuk T. Morphological changes in tissues of organs in rats with arterial hypertension (SHR) with treatment of hypotensive medicines (with ramipril and candesartan) in combination with corvitin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2020;1(23):39–44. DOI: 10.15587/2519-4852.2020.197300.
4. Vangen-Lonne A. M., Wilsgaard T., Johnsen S. H., Lochen M. L., Njolstad I., Mathiesen E.B. Declining incidence of ischemic stroke: what is the impact of changing risk factors? The Tromso Study 1995 to 2012. *Stroke.* 2017;48:544–550. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.014377.
5. Gierthmuehlen M., Plachta D. T., Zentner J. Implant-mediated therapy of arterial hypertension. *Current hypertension reports*. 2020;22(2):1–9. DOI: 10.1007/s11906-020-1019-7.
6. Саютина Е. В. Фиксированные комбинации в современных алгоритмах лечения артериальной гипертензии. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018;17(6):86–94. DOI: 10.15829/1728-8800-2018-6-86-94.
7. Mugellini A., Nieswandt V. Candesartan plus hydrochlorothiazide: an overview of its use and efficacy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012;13(18):2699–709. DOI: 10.1517/14656566.2012.745511.
8. Melian E. B., Jarvis B. Candesartan cilexetil plus hydrochlorothiazide combination. *Drugs*. 2002;62(5):787–816. DOI: 10.2165/00003495-200262050-00006.
9. Bönner G., Fuchs W. Fixed combination of candesartan with hydrochloro-thiazide in patients with severe primary hypertension. *Current medical research and opinion.* 2004;20(5):597–602. DOI: 10.1185/030079904125003395.
10. Hosaka M., Metoki H., Satoh M., Ohkubo T., Asayama K., Kikuya M., Inoue R., Obara T., Hirose T., Imai Y. Randomized trial comparing the velocities of the antihypertensive effects on home blood pressure of candesartan and candesartan with hydrochlorothiazide. *Hypertension Research.* 2015;38(10):701–707. DOI: 10.1038/hr.2015.64
11. Mancia G., Omboni S. Candesartan plus hydrochlorothiazide fixed combination vs previous monotherapy plus diuretic in poorly controlled essential hypertensive patients. *Blood Pressure.* 2004;13(2):11–7. DOI: 10.1080/08038020410035574.
12. Shina S. K. Monotherapy versus combination therapy for the initial treatment of hypertension. *Journal of Clinical and Preventive Cardiology.* 2020;9(2):78–83. DOI: 10.4103/JCPC.JCPC_27_20.
13. Koenig W. Comparison of the efficacy and tolerability of combination tablets containing candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide or losartan and hydrochlorothiazide in patients with moderate to severe hypertension. *Clinical Drug Investigation*. 2000;19(4):239–246. DOI: 10.2165/00044011-200019040-00001.
14. Zhao X., Wang X. Candesartan targeting of angiotensin II type 1 receptor demonstrates benefits for hypertension in pregnancy via the NF-κB signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):705–714. DOI: 10.3892/mmr.2018.9070.
15. McClellan K. J., Goa K. L. Candesartan Cilexetil. *Drugs* 1998;56:847–869. DOI: 10.2165/00003495-199856050-00013.
16. Hripcsak G., Suchard M. A., Shea S., Chen R., You S. C., Pratt N., Madigan D., Krumholz H. M., Ryan P. B., Schuemie M. J. Comparison of cardiovascular and safety outcomes of chlorthalidone vs hydrochlorothiazide to treat hypertension. *JAMA internal medicine*. 2020;180(4):542–551. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.7454.
17. Dineva S, Uzunova K, Pavlova V, Filipova E, Kalinov K, Vekov T. Comparative efficacy and safety of chlorthalidone and hydrochlorothiazide—meta-analysis. *Journal of human hypertension*. 2019;33:766–774. DOI: 10.1038/s41371-019-0255-2.
18. Rosolová H. Combined therapy of arterial hypertension. *Vnitrni lekarstvi*. 2013;59(5):366–369.
19. Ruzicka M., Leenen F. H. Monotherapy versus combination therapy as first line treatment of uncomplicated arterial hypertension. *Drugs*. 2001;61(7):943–954. DOI: 10.2165/00003495-200161070-00004.
20. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 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 18.10.2021.
21. Bonthu M. G., Atmakuri L. R., Jangala V. R. Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC-MS/MS. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54(1). DOI: 10.1590/s2175-97902018000117381.
22. Singh B., Lokhandae R. S., Dwivedi A., Sharma S., Dubey N. Improved simultaneous quantitation of candesartan and hydrochlorthiazide in human plasma by UPLC–MS/MS and its application in bioequivalence studies. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014;4(2):144–152. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.05.003.

23. Erk N. Simultaneous analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in human plasma and dosage forms using HPLC with a photodiode array detector. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2003;26(15):2581–2591. DOI: 10.1081/JLC-120023802.
24. Bharathi D. V., Hotha K. K., Chatki P. K., Satyanarayana V., Venkateswarlu V. LC–MS/MS method for simultaneous estimation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and its use in clinical pharmacokinetics. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1195–1204. DOI: 10.4155/bio.12.83.
25. Hamid S., Beg A. E., Muhammad I. N., Hassan S., Hassan A., Akram A., Alladin N. Development and validation of HPLC method for the determination of Candesartan in human plasma. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2018;31(6):2323–2327.
26. Nawaz H. A., Masood M. I., Abbas M., Usman M., Khan A. M., Rasheed H., Riffat S. Evaluation of gender difference in pharmacokinetics of Candesartan cilexetil in the fasted state by RP-HPLC: A single dose comparative study. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2019;32(3).
27. Forjan V., Maričič L. C., Prosen H., Vončina D. B. Determination of Candesartan in Human Plasma using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*. 2016;63(1):38–46. DOI: 10.17344/acsi.2015.1836.
28. Zendelovska D., Stafilov T., Miloševski P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(2):71–76. DOI: 10.1002/bmc.293.
29. Liu F., Zhang J., Xu Y., Gao S., Guo Q. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;44(5):1187–1191. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.04.020.
30. Fang W., Xie W., Hsieh J. K., Matuszewski B. K. Development and application of HPLC methods with tandem mass spectrometric detection for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine using 96-well liquid-liquid extraction. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2005;28(17):2681–2703. DOI: 10.1080/10826070500224666.
31. Candesartan. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00796. Accessed: 18.10.2021.
32. Valsartan. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00177. Accessed: 18.10.2021.
33. Hydrochloride. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00999. Accessed: 18.10.2021.
34. Indapamide. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00808. Accessed: 18.10.2021.
35. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Accessed: 18.10.2021.
36. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation. Accessed: 18.10.2021.

REFERENCES

1. *VOZ publikuet statistiku o vedushchikh prichinakh smertnosti i invalidnosti vo vsem mire za period 2000–2019 gg*. [Who reveals leading causes of death and disability worldwide 2000-2019]. Available at: https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019. Accessed: 18.10.2021. (In Russ.)
2. Jordan J., Kurschat C., Reuter H. Arterial hypertension–diagnosis and treatment. *Deutsches* Ärzteblatt *International*. 2018;115:557–568. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0557.
3. Marushchak A., Rogovyy Y., Doroshko V., Shvets V., Savchuk T. Morphological changes in tissues of organs in rats with arterial hypertension (SHR) with treatment of hypotensive medicines (with ramipril and candesartan) in combination with corvitin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2020;1(23):39–44. DOI: 10.15587/2519-4852.2020.197300.
4. Vangen-Lonne A. M., Wilsgaard T., Johnsen S. H., Lochen M. L., Njolstad I., Mathiesen E.B. Declining incidence of ischemic stroke: what is the impact of changing risk factors? The Tromso Study 1995 to 2012. *Stroke*. 2017;48:544–550. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.014377.
5. Gierthmuehlen M., Plachta D. T., Zentner J. Implant-mediated therapy of arterial hypertension. *Current hypertension reports*. 2020;22(2):1–9. DOI: 10.1007/s11906-020-1019-7.
6. Sayutina E. V. Fixed combinations in modern hypertension treatment algorithms. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2018;17(6):86–94. (In Russ.) DOI: 10.15829/1728-8800-2018-6-86-94.
7. Mugellini A., Nieswandt V. Candesartan plus hydrochlorothiazide: an overview of its use and efficacy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012;13(18):2699–709. DOI: 10.1517/14656566.2012.745511.
8. Melian E. B., Jarvis B. Candesartan cilexetil plus hydrochlorothiazide combination. *Drugs*. 2002;62(5):787–816. DOI: 10.2165/00003495-200262050-00006.
9. Bönner G., Fuchs W. Fixed combination of candesartan with hydrochloro-thiazide in patients with severe primary hypertension. *Current medical research and opinion*. 2004;20(5):597–602. DOI: 10.1185/030079904125003395.
10. Hosaka M., Metoki H., Satoh M., Ohkubo T., Asayama K., Kikuya M., Inoue R., Obara T., Hirose T., Imai Y. Randomized trial comparing the velocities of the antihypertensive effects on home blood pressure of candesartan and candesartan with hydrochlorothiazide. *Hypertension Research*. 2015;38(10):701–707. DOI: 10.1038/hr.2015.64
11. Mancia G., Omboni S. Candesartan plus hydrochlorothiazide fixed combination vs previous monotherapy plus diuretic in poorly controlled essential hypertensive patients. *Blood Pressure*. 2004;13(2):11–7. DOI: 10.1080/08038020410035574.
12. Shina S. K. Monotherapy versus combination therapy for the initial treatment of hypertension. *Journal of Clinical and Preventive Cardiology*. 2020;9(2):78–83. DOI: 10.4103/JCPC.JCPC_27_20.
13. Koenig W. Comparison of the efficacy and tolerability of combination tablets containing candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide or losartan and hydrochlorothiazide in patients with moderate to severe hypertension. *Clinical Drug Investigation*. 2000;19(4):239–246. DOI: 10.2165/00044011-200019040-00001.
14. Zhao X., Wang X. Candesartan targeting of angiotensin II type 1 receptor demonstrates benefits for hypertension in pregnancy via the NF-κB signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):705–714. DOI: 10.3892/mmr.2018.9070.
15. McClellan K. J., Goa K. L. Candesartan Cilexetil. *Drugs* 1998;56:847–869. DOI: 10.2165/00003495-199856050-00013.
16. Hripcsak G., Suchard M. A., Shea S., Chen R., You S. C., Pratt N., Madigan D., Krumholz H. M., Ryan P. B., Schuemie M. J. Comparison of cardiovascular and safety outcomes of chlorthalidone vs hydrochlorothiazide to treat hypertension. *JAMA internal medicine*. 2020;180(4):542–551. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.7454.
17. Dineva S, Uzunova K, Pavlova V, Filipova E, Kalinov K, Vekov T. Comparative efficacy and safety of chlorthalidone and hydrochlorothiazide—meta-analysis. *Journal of human hypertension*. 2019;33:766–774. DOI: 10.1038/s41371-019-0255-2.
18. Rosolová H. Combined therapy of arterial hypertension. *Vnitrni lekarstvi*. 2013;59(5):366–369.
19. Ruzicka M., Leenen F. H. Monotherapy versus combination therapy as first line treatment of uncomplicated arterial hypertension. *Drugs*. 2001;61(7):943–954. DOI: 10.2165/00003495-200161070-00004.
20. *Reshenie Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 3 noyabrya 2016 goda № 85 "Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza"* [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 85 "On

approval of the Rules for conducting studies of bioequivalence of drugs within the framework of the Eurasian Economic Union"]. Available at: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Accessed: 18.10.2021. (In Russ.)

21. Bonthu M. G., Atmakuri L. R., Jangala V. R. Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC-MS/MS. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54(1). DOI: 10.1590/s2175-97902018000117381.
22. Singh B., Lokhandae R. S., Dwivedi A., Sharma S., Dubey N. Improved simultaneous quantitation of candesartan and hydrochlorthiazide in human plasma by UPLC–MS/MS and its application in bioequivalence studies. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014;4(2):144–152. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.05.003.
23. Erk N. Simultaneous analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in human plasma and dosage forms using HPLC with a photodiode array detector. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2003;26(15):2581–2591. DOI: 10.1081/JLC-120023802.
24. Bharathi D. V., Hotha K. K., Chatki P. K., Satyanarayana V., Venkateswarlu V. LC–MS/MS method for simultaneous estimation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and its use in clinical pharmacokinetics. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1195–1204. DOI: 10.4155/bio.12.83.
25. Hamid S., Beg A. E., Muhammad I. N., Hassan S., Hassan A., Akram A., Alladin N. Development and validation of HPLC method for the determination of Candesartan in human plasma. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2018;31(6):2323–2327.
26. Nawaz H. A., Masood M. I., Abbas M., Usman M., Khan A. M., Rasheed H., Riffat S. Evaluation of gender difference in pharmacokinetics of Candesartan cilexetil in the fasted state by RP-HPLC: A single dose comparative study. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2019;32(3).
27. Forjan V., Maričič L. C., Prosen H., Vončina D. B. Determination of Candesartan in Human Plasma using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*. 2016;63(1):38–46. DOI: 10.17344/acsi.2015.1836.
28. Zendelovska D., Stafilov T., Miloševski P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(2):71–76. DOI: 10.1002/bmc.293.
29. Liu F., Zhang J., Xu Y., Gao S., Guo Q. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;44(5):1187–1191. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.04.020.
30. Fang W., Xie W., Hsieh J. K., Matuszewski B. K. Development and application of HPLC methods with tandem mass spectrometric detection for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine using 96-well liquid-liquid extraction. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2005;28(17):2681–2703. DOI: 10.1080/10826070500224666.
31. Candesartan. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00796. Accessed: 18.10.2021.
32. Valsartan. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00177. Accessed: 18.10.2021.
33. Hydrochloride. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00999. Accessed: 18.10.2021.
34. Indapamide. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00808. Accessed: 18.10.2021.
35. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Accessed: 18.10.2021.
36. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation. Accessed: 18.10.2021.