

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145>  
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

## Совместное определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров<sup>1,3</sup>, П. К. Карнакова<sup>1✉</sup>, О. А. Арчакова<sup>1</sup>, Д. С. Щелгачева<sup>1</sup>, Н. С. Багаева<sup>1</sup>,  
И. Е. Шохин<sup>1</sup>, К. Я. Заславская<sup>2</sup>, П. А. Белый<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

<sup>2</sup> ООО «ПРОМОМЭД РУС», 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

<sup>3</sup> Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

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

ORCID: Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>;  
О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;  
Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>;  
К. Я. Заславская – <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>; П. А. Белый – <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>.

Статья поступила: 01.02.2023

Статья принята в печать: 09.03.2023

Статья опубликована: 25.05.2023

### Резюме

**Введение.** В настоящее время предполагается, что вирус SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), вызывающий новую коронавирусную инфекцию COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) останется постоянной глобальной угрозой. В связи с этим, вопрос разработки лекарственных препаратов для лечения COVID-19 остается актуальным. Комбинация нирматрелвира с ритонавиром обладает прямым противовирусным действием: при ее применении удастся повысить эффективность терапии и снизить риск осложнений COVID-19. Разработка и валидация методики совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека является необходимой задачей для проведения аналитической части клинического исследования с целью дальнейшего изучения фармакокинетических параметров.

**Цель.** Целью исследования является разработка и валидация методики совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшего изучения фармакокинетики.

**Материалы и методы.** Определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом. Внутренний стандарт: прометазин. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А), 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Колонка: Phenomenex Luna C18 50 × 2,0 мм, 5 мкм. Аналитический диапазон методики: 50,00–10000,00 нг/мл для нирматрелвира, 5,00–1000,00 нг/мл для ритонавира в плазме крови. Источник ионизации и ионизация: электроспрей, положительная. Условия детектирования: 499,90 → 110,10 m/z, 499,90 → 319,20 m/z (нирматрелвир), 720,90 → 426,00 m/z, 720,90 → 296,20 m/z, 720,90 → 268,10 m/z, 720,90 → 197,10 m/z, 720,90 → 139,90 m/z (ритонавир), 285,15 → 198,05 m/z (прометазин).

**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.

**Заключение.** Разработана и валидирована методика совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10000,00 нг/мл для нирматрелвира, 5,00–1000,00 нг/мл для ритонавира в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований комбинированных препаратов нирматрелвира и ритонавира.

**Ключевые слова:** нирматрелвир, ритонавир, COVID-19, плазма, 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, П. К. Карнакова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская и П. А. Белый отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

**Для цитирования:** Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Совместное определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):135–145. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145>

## Simultaneous Determination of Nirmatrelvir and Ritonavir in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Timofey N. Komarov<sup>1,3</sup>, Polina K. Karnakova<sup>1✉</sup>, Olga A. Archakova<sup>1</sup>, Dana S. Shchegacheva<sup>1</sup>,  
Natalia S. Bagaeva<sup>1</sup>, Igor E. Shohin<sup>1</sup>, Kira Ya. Zaslavskaya<sup>2</sup>, Petr A. Bely<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russian Federation

<sup>2</sup> LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russian Federation

<sup>3</sup> RUDN University, 6 Miklukho-Maklaya St, Moscow, 117198, Russian Federation

© Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А., 2023

© Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchegacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., 2023

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

ORCID: Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>;  
Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Shchegacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;  
Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>;  
Kira Ya. Zaslavskaya – <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>; Petr A. Bely – <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>.

Received: 01.02.2023

Revised: 09.03.2023

Published: 25.05.2023

## Abstract

**Introduction.** SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) is expected to remain a persistent global threat. Therefore, development of coronavirus disease 2019 (COVID-19) drugs is the most urgent global issue. Nirmatrelvir and ritonavir combination is an oral antiviral drug combination with activity against SARS-CoV-2. Nirmatrelvir and ritonavir combination is highly efficacious in reducing the risk of COVID-19. The study describes development and validation of high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of nirmatrelvir and ritonavir in human blood plasma. The method could be applied in pharmacokinetic study of nirmatrelvir and ritonavir.

**Aim.** The aim of this study is to develop and validate a HPLC-MS/MS bioanalytical method for the determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma.

**Materials and methods.** The determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation. Internal standard: promethazine. Mobile phase: 0.1% formic acid solution in water (Eluent A), 0.1% formic acid in acetonitrile (Eluent B). Column: Phenomenex Luna C18 50 × 2.0 mm, 5 µm. Analytical range: 50.00–10000.00 ng/mL for nirmatrelvir, 5.00–1000.00 ng/mL for ritonavir in human plasma. Ionization source and ionization: electrospray ionization, positive. Detection conditions: 499.90 → 110.10 m/z, 499.90 → 319.20 m/z (nirmatrelvir), 720.90 → 426.00 m/z, 720.90 → 296.20 m/z, 720.90 → 268.10 m/z, 720.90 → 197.10 m/z, 720.90 → 139.90 m/z (ritonavir), 285.15 → 198.05 m/z (promethazine).

**Results and discussion.** This method was validated for selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

**Conclusion.** The HPLC-MS/MS method for quantitative determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma was developed and validated. The analytical range was 50.00–10000.00 ng/mL for nirmatrelvir, 5.00–1000.00 ng/mL for ritonavir in human plasma. This method was applied to investigate the pharmacokinetics of nirmatrelvir and ritonavir.

**Keywords:** nirmatrelvir, ritonavir, COVID-19, plasma, 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. Shchegacheva, Polina K. Karnakova developed and validated the analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out the statistical analysis. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely conceived the study and were in charge of direction and planning. All authors discussed the results.

**For citation:** Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchegacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A. Simultaneous determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(2):135–145. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145>

## ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), вызванная вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), внесла значительные коррективы в жизнь населения планеты. Значения показателей заболеваемости и смертности по всему миру достигли чрезвычайно высоких значений [1]. Согласно статистическим данным, на январь 2023 года во всем мире было зафиксировано более 663 млн случаев заражения вирусом SARS-CoV-2, из которых около 6,7 млн закончились летальным исходом. На территории России на сегодняшний день зарегистрировано более 21 млн случаев данного заболевания, число летальных исходов составляет более 394 тысяч<sup>1</sup>. Более миллиона человек, из числа переболевших COVID-19, страдают от долгосрочных последствий данного заболевания, которые на данный момент еще до конца не изучены [2]. Также ожидается, что COVID-19 останется постоянной глобальной угро-

зой [3]. По данной причине вопрос разработки лекарственных препаратов для лечения COVID-19 остается актуальным.

В настоящее время во временных методических рекомендациях Министерства здравоохранения РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (версия № 17 от 14.12.2022) выделяются несколько препаратов, которые могут быть использованы при лечении COVID-19, в их число входит комбинация нирматрелвира с ритонавиrom. Данная комбинация одобрена EMA и FDA для экстренного применения у пациентов с COVID-19; в России применяется для лечения COVID-19 у взрослых в легкой и среднетяжелой форме течения, в том числе у пациентов с повышенным риском прогрессирования заболевания до более тяжелой формы и не требующих дополнительной оксигенотерапии<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_347896/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/) Ссылка активна на 19.01.2023.

<sup>1</sup> WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/> Accessed: 19.01.2023.

Нирматрелвир ((1R,2S,5S)-N-[(1S)-1-циано-2-[(3S)-2-оксопирролидин-3-yl]этил]-3-[(2S)-3,3-диметил-2-[(2,2,2-трифлуороацетил)амино]бутаноил]-6,6-диметил-3-азабицикло[3.1.0]гексан-2-карбоксамид), НИРМ [Nirmatrelvir, NIRM]) – препарат, обладающий противовирусной активностью. В основе механизма действия нирматрелвира лежит ингибирование протеазы вируса SARS-CoV-2 3CL. Ингибирование данной протеазы предотвращает репликацию вируса SARS-CoV-2 [4].

Ритонавир ([[(1,3-Тиазол-5-ил)метил]{N-[(2S,3S,5S)-3-гидрокси-5-[(2S)-3-метил-2-[(метил{[2-(пропан-2-ил)-1,3-тиазол-4-ил]метил}карбамоил)амино]бутанамидо]-1,6-дифенилгексан-2-ил]карбамат), РИТ [Ritonavir, RIT]) – ингибитор протеазы вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса иммунодефицита человека типа 2 и цитохрома P450 (CYP3A4) [5].

Комбинация нирматрелвира с ритонавиром относится к препаратам прямого противовирусного действия. При применении данной комбинации удается повысить эффективность терапии и снизить риск осложнений COVID-19 [6]. В данной комбинации ритонавир выступает в качестве фармакокинетического бустера и замедляет метаболизм нирматрелвира. Благодаря этому нирматрелвир проявляет активность в течение более длительного времени, в организме сохраняются более высокие концентрации препарата, элиминация замедляется. При пероральном введении нирматрелвира в комбинации с ритонавиром удается достичь высокой биодоступности, что является значительным преимуществом, так как хорошая пероральная доступность не требует парентерального введения и позволяет использовать данный препарат не только у госпитализированных пациентов, но и среди амбулаторных больных [7].

Разработка и валидация методики совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека – процедура, необходимая для проведения аналитического этапа исследования с целью дальнейшего изучения фармакокинетических параметров после однократного и многократного перорального применения данной комбинации здоровыми добровольцами.

В настоящее время опубликован ряд фармакокинетических исследований по количественному определению нирматрелвира и ритонавира в биологических жидкостях человека. Для определения данных веществ применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)]. В рассмотренных методиках ионизацию проводят электрораспылением в положительном режиме. В качестве пробоподготовки используется способ осаждения белков метанолом (MeOH) или ацетонитрилом (ACN), а также способ осаждения белков ацетонитрилом с последующим разбавлением (таблица 1).

Проанализировав литературные данные о разработке методик совместного количественного определения нирматрелвира и ритонавира, было сделано заключение об отсутствии опубликованных методик одновременно с простым способом пробоподготовки и достаточной чувствительностью. В связи с этим, было принято решение самостоятельно разработать и валидировать методику совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован 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, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, краном переключения линии потока высокого давления и с tandemным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 с тройным квадруполом. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония).

### Реактивы и растворы

Во время проведения исследования были использованы следующие химические реактивы: ацетонитрил (класс «UHPLC Supergradient, ACS», PanReac & AppliChem, Германия, Испания); ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия); метанол (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания); вода деминерализованная (I класс чистоты).

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы стандартные образцы нирматрелвира (Ningbo Mindo Pharmaceutical Co., Ltd, Индия, содержание 99,50 %), ритонавира (Mylan Laboratories Limited, Индия, содержание 100,40 %) и прометазина гидрохлорида (USP reference standard, Франция, содержание 99,90 %).

Исходные стандартные растворы (ИСР) нирматрелвира и ритонавира готовили путем растворения навесок субстанций в метаноле. ИСР внутреннего стандарта (BC [internal standard, IS]) прометазина готовили путем растворения навески субстанции прометазина гидрохлорида в ацетонитриле. Концентрация нирматрелвира в ИСР составила 400 000,00 нг/мл, ритонавира – 50 000,00 нг/мл, прометазина – 60 000,00 нг/мл. Смешанные рабочие стандартные растворы (РСР) нирматрелвира и ритонавира готовили из ИСР, путем их разведения метанолом до получения в плазме концентраций, соответствующих уровням 1–8, нижнему пределу количественного определения (НПКО) [Lower

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения нирматрелвира и ритонавира  
Table 1. Bioanalytical methods of nirmatrelvir and ritonavir quantitative determination

| Аналитический метод<br>Analytical method | Объект анализа<br>Object                                | Пробоподготовка<br>Sample preparation                                                                   | Аналитический диапазон, нг/мл<br>Analytical range, ng/mL |                | Ссылка<br>Reference |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------|---------------------|
| СВЭЖХ-МС/МС<br>UPLC-MS/MS                | Плазма крови человека<br>Human plasma                   | Осаждение<br>Protein precipitation                                                                      | РИТ<br>RIT                                               | 10,00–1000,00  | [8]                 |
|                                          |                                                         |                                                                                                         | НИРМ<br>NIRM                                             | 40,00–4000,00  |                     |
| ВЭЖХ-МС/МС<br>HPLC-MS/MS                 | Плазма крови человека<br>Human plasma                   | Осаждение MeOH<br>Protein precipitation by methanol                                                     | РИТ<br>RIT                                               | 2,00–2000,00   | [9]                 |
|                                          |                                                         |                                                                                                         | НИРМ<br>NIRM                                             | 10,00–10000,00 |                     |
| ВЭЖХ-МС/МС<br>HPLC-MS/MS                 | Плазма крови человека<br>Human plasma                   | Осаждение ACN с последующим разбавлением<br>Protein precipitation by acetonitrile, followed by dilution | РИТ<br>RIT                                               | 5,00–5000,00   | [6]                 |
|                                          |                                                         |                                                                                                         | НИРМ<br>NIRM                                             | 10,0–10000,00  |                     |
| ВЭЖХ-МС/МС<br>HPLC-MS/MS                 | Плазма крови человека, сыворотка<br>Human plasma, serum | Осаждение ACN<br>Protein precipitation by acetonitrile                                                  | РИТ<br>RIT                                               | 10,87–3516,00  | [10]                |
|                                          |                                                         |                                                                                                         | НИРМ<br>NIRM                                             | 14,69–4753,00  |                     |
| ВЭЖХ-МС/МС<br>HPLC-MS/MS                 | Плазма крови человека<br>Human plasma                   | Осаждение<br>Protein precipitation                                                                      | РИТ<br>RIT                                               | 10,00–1000,00  | [11]                |
|                                          |                                                         |                                                                                                         | НИРМ<br>NIRM                                             | 50,00–5000,00  |                     |
| ВЭЖХ-МС/МС<br>HPLC-MS/MS                 | Плазма крови человека<br>Human plasma                   | Осаждение ACN<br>Protein precipitation by acetonitrile                                                  | РИТ<br>RIT                                               | 10,0–50000,00  | [12]                |
|                                          |                                                         |                                                                                                         | НИРМ<br>NIRM                                             | 10,0–50000,00  |                     |

limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], средним [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2). РСР ВС готовили путем разведения ИСР ацетонитрилом до получения в плазме концентраций, составляющих 1,00 нг/мл.

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

Table 2. Concentrations at calibration levels and quality control samples

| Уровень<br>Level | Концентрация аналита, нг/мл<br>Analyte concentration, ng/mL |            | Концентрация ВС,<br>нг/мл<br>IS concentration,<br>ng/mL |
|------------------|-------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------|
|                  | НИРМ<br>NIRM                                                | РИТ<br>RIT | ПРОМ<br>PROM                                            |
| 1                | 50,00                                                       | 5,00       | 1,00                                                    |
| 2                | 250,00                                                      | 25,00      | 1,00                                                    |
| 3                | 500,00                                                      | 50,00      | 1,00                                                    |
| 4                | 1000,00                                                     | 100,00     | 1,00                                                    |
| 5                | 2500,00                                                     | 250,00     | 1,00                                                    |
| 6                | 5000,00                                                     | 500,00     | 1,00                                                    |
| 7                | 7500,00                                                     | 750,00     | 1,00                                                    |
| 8                | 10000,00                                                    | 1000,00    | 1,00                                                    |
| LLOQ             | 50,00                                                       | 5,00       | 1,00                                                    |
| L                | 150,00                                                      | 15,00      | 1,00                                                    |
| M1               | 2000,00                                                     | 200,00     | 1,00                                                    |
| M2               | 4000,00                                                     | 450,00     | 1,00                                                    |
| H                | 8000,00                                                     | 800,00     | 1,00                                                    |

Образцы интактной плазмы, ИСР и РСР хранили в морозильной камере при температуре  $-42,5 \pm 7,5$  °C.

Пробоподготовка

В центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» аликвотировали образец, прибавляли РСР ВС прометазина, затем проводили осаждение белков с помощью ацетонитрила (1:3). Далее образец перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» и проводили центрифугирование. После центрифугирования супернатант переносили в виалы и помещали в автосамплер хроматографа. Способ пробоподготовки представлен в виде схемы на рисунке 1.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna C18 50 × 2,0 мм, 5 мкм.
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges C18 4 × 3,0 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: элюент А: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему); элюент В: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).
- Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.

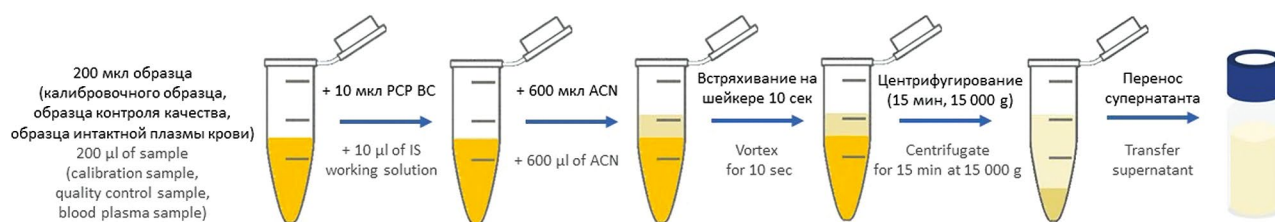


Рисунок 1. Схема пробоподготовки

Figure 1. Sample preparation

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

| Время, мин<br>Time, min | Элюент А, %<br>Eluent A, % | Элюент В, %<br>Eluent B, % |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0,00                    | 95,00                      | 5,00                       |
| 0,50                    | 95,00                      | 5,00                       |
| 1,50                    | 0,00                       | 100,00                     |
| 2,50                    | 0,00                       | 100,00                     |
| 2,60                    | 95,00                      | 5,00                       |
| 4,00                    | 95,00                      | 5,00                       |

- Объем вводимой пробы: 1 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–4,00 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, 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

| Название вещества<br>Name | Напряжение на капилляре<br>Capillary voltage | Режим ионизации<br>Ion mode | Условия детектирования<br>Detection conditions                                                  |
|---------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| НИРМ<br>NIRM              | 4,5                                          | +                           | 499,90 → 110,10;<br>499,90 → 319,20                                                             |
| РИТ<br>RIT                | 4,5                                          | +                           | 720,90 → 426,00;<br>720,90 → 296,20;<br>720,90 → 268,10;<br>720,90 → 197,10;<br>720,90 → 139,90 |
| ПРОМ<br>PROM              | 4,5                                          | +                           | 285,15 → 198,05                                                                                 |

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

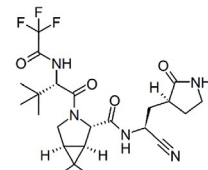
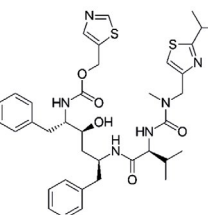
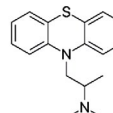
### Разработка методики

В качестве внутреннего стандарта (ВС) для нирматрелвира и ритонавира был выбран прометазин ((RS)-N,N,α-триметил-10Н-фенотиазин-10-этанамина). Для получения необходимых хроматографических параметров подбиралось вещество, схожее с нирма-

трелвиром и ритонавиром по структуре и физико-химическим свойствам (таблица 5).

Таблица 5. Структура и физико-химические свойства анализируемых веществ и внутреннего стандарта

Table 5. Structure and physicochemical properties of the analytes and IS

| Название вещества<br>Name              | Физико-химические свойства<br>Physicochemical properties              | Структурная формула<br>Molecular structure                                                                                    |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| НИРМ <sup>1</sup><br>NIRM <sup>1</sup> | <p>pKa</p> <p>logP</p> <p>Молекулярная масса<br/>Molecular weight</p> | <p>7,1</p> <p>2,12</p> <p>499,535</p>    |
| РИТ <sup>2</sup><br>RIT <sup>2</sup>   | <p>pKa</p> <p>logP</p> <p>Молекулярная масса<br/>Molecular weight</p> | <p>13,68</p> <p>4,24</p> <p>720,944</p>  |
| ПРОМ <sup>3</sup><br>PROM <sup>3</sup> | <p>pKa</p> <p>logP</p> <p>Молекулярная масса<br/>Molecular weight</p> | <p>9,05</p> <p>4,29</p> <p>284,419</p>   |

**Примечание.** <sup>1</sup> Nirmatrelvir. Drugbank. Доступно по: <https://go.drugbank.com/drugs/DB16691>. Ссылка активна на 19.01.2023.

<sup>2</sup> Ritonavir. Drugbank. Доступно по: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00503>. Ссылка активна на 19.01.2023.

<sup>3</sup> Promethazine. Drugbank. Доступно по: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01069>. Ссылка активна на 19.01.2023.

**Note.** <sup>1</sup> Nirmatrelvir. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB16691>. Accessed: 19.01.2023.

<sup>2</sup> Ritonavir. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00503>. Accessed: 19.01.2023.

<sup>3</sup> Promethazine. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01069>. Accessed: 19.01.2023.

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 и выбраны наиболее интенсивные переходы (см. таблица 4). Предполагаемые пути фрагментации нирматрелвира и ритонавира представлены на рисунках 2, 3.

В качестве осадителя был выбран ацетонитрил, так как при его использовании происходило наиболее полное осаждение белков плазмы крови, а также удалось добиться оптимальной формы хроматографических пиков. При этом использование данного способа пробоподготовки является наименее трудоемким, так как не требует дополнительных

манипуляций и отдельных условий проведения анализа и не влияет на стабильность образцов при их хранении в автосамплере хроматографа, в отличие от ЖЖЭ, осаждения белков трифторуксусной кислотой или метанолом.

В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств нирматрелвира и ритонавира для хроматографического разделения данной комбинации веществ была выбрана колонка Phenomenex Luna C18, 50 × 2,0 мм, 5 мкм.

### Валидация методики

Валидация разработанной биоаналитической методики была проведена в соответствии с правилами проведения исследований биоэквивалентности

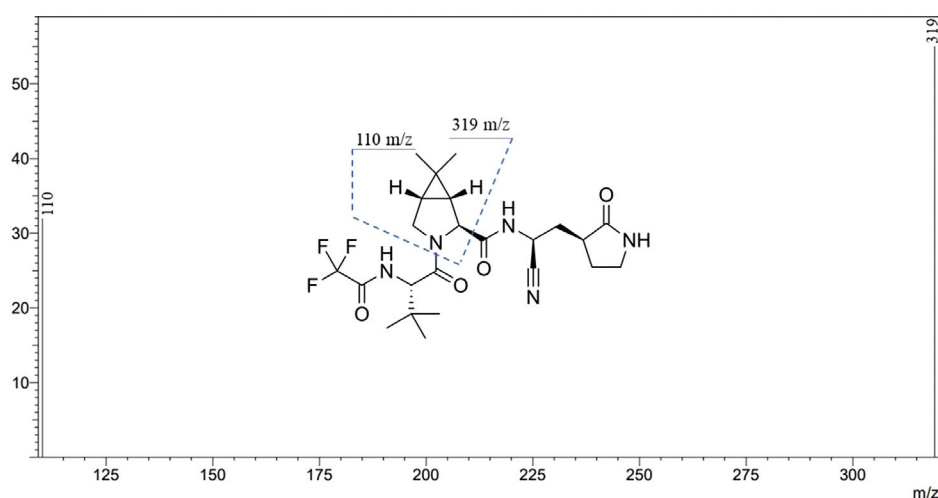


Рисунок 2. Предполагаемые пути фрагментации нирматрелвира

Figure 2. MS/MS fragmentation of nirmatrelvir

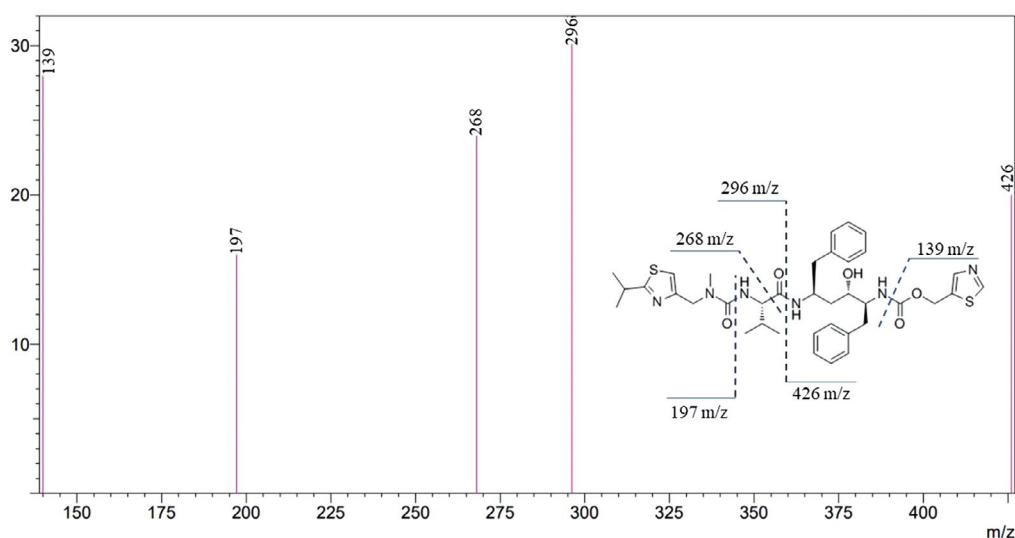


Рисунок 3. Предполагаемые пути фрагментации ритонавира

Figure 3. MS/MS fragmentation of ritonavir

в рамках Евразийского экономического союза<sup>1</sup> на основе правил руководств EMA<sup>2</sup> и FDA<sup>3</sup>. Методика прошла полную валидацию по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность и прецизионность, нижний предел количественного определения (НПКО), степень извлечения, эффект матрицы, перенос пробы, стабильность (краткосрочная стабильность аналита в матрице («насто́льная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке; стабильность ИСР и РСР; долгосрочная стабильность аналита в матрице). Основные валидационные характеристики с критериями приемлемости представлены в таблице 6.

### Селективность

Были проанализированы шесть различных образцов интактной плазмы крови, по два различных образца гемолизной интактной плазмы крови и гиперли-

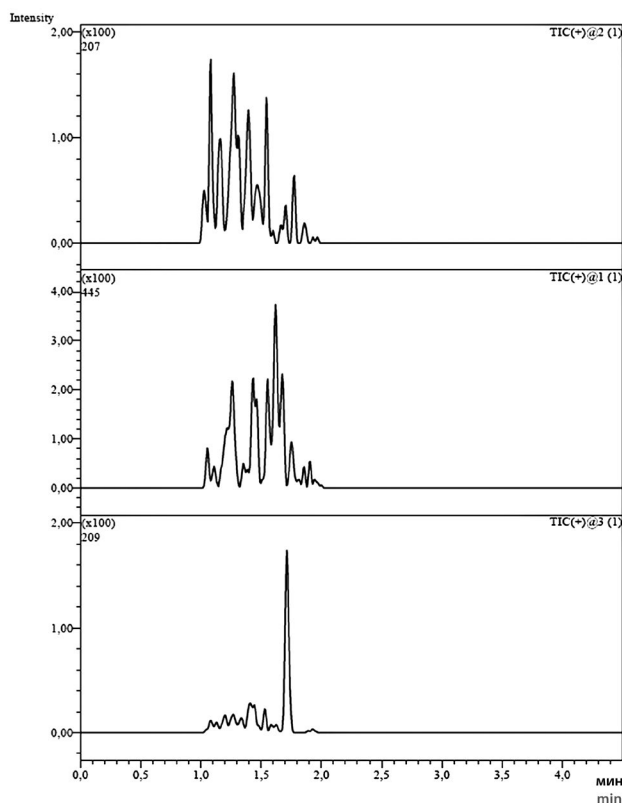


Рисунок 4. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 4. Chromatogram of blank human plasma sample

<sup>1</sup> Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>/ Ссылка активна на 19.01.2023.

<sup>2</sup> European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/> Accessed: 19.01.2023.

<sup>3</sup> Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/> Accessed: 19.01.2023.

пидемической интактной плазмы крови, не содержащие анализируемых веществ, а также образцы с прибавлением РСР до концентраций, соответствующих уровню НПКО (см. таблица 2). Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека представлена на рисунке 4.

Таблица 6. Основные валидационные характеристики

Table 6. Validation characteristics

| Валидационная характеристика<br>Validation characteristics                        | Критерий приемлемости<br>Acceptance criteria                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Селективность<br>Selectivity                                                      | Образец интактной плазмы крови: сигнал аналита $\leq 20\%$ от сигнала НПКО; сигнал ВС $\leq 5\%$ от сигнала ВС<br>Blank samples: the analyte $\leq 20\%$ LLOQ, the IS response $\leq 5\%$                                             |
| Калибровочная кривая<br>Calibration curve                                         | $R \geq 0,99$ ; $-20\% \leq E, \% \leq 20\%$ – для концентрации на уровне НПКО; $-15\% \leq E, \% \leq 15\%$ – для концентраций остальных точек<br>$R \geq 0,99$ ; $-15\% \leq E \leq 15\%$ ; except $-20\% \leq E \leq 20\%$ at LLOQ |
| Точность (внутри циклов, между циклами)<br>Accuracy (inter-day, intra-day)        | $-20\% \leq E, \% \leq 20\%$ – для концентрации на уровне НПКО; $-15\% \leq E, \% \leq 15\%$ – для концентраций остальных точек<br>$-15\% \leq E \leq 15\%$ ; except $-20\% \leq E \leq 20\%$ at LLOQ                                 |
| Прецизионность (внутри циклов, между циклами)<br>Precision (inter-day, intra-day) | $RSD \leq 20\%$ – для концентрации на уровне НПКО; $RSD \leq 15\%$ – для концентраций остальных точек<br>$RSD \leq 15\%$ , except $RSD \leq 20\%$ at LLOQ                                                                             |
| НПКО<br>LLOQ                                                                      | $RSD \leq 20\%$ , $-20\% \leq E, \% \leq 20\%$                                                                                                                                                                                        |
| Степень извлечения<br>Spike recovery                                              | $RSD \leq 15\%$ ;                                                                                                                                                                                                                     |
| Эффект матрицы<br>Matrix effect                                                   | Фактор матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы ВС: $RSD \leq 15\%$<br>IS-normalized matrix factors of the analytes: $RSD \leq 15\%$                                                                        |
| Стабильность<br>Stability                                                         | $-15\% \leq E, \% \leq 15\%$                                                                                                                                                                                                          |
| Перенос пробы<br>Carry-over effect                                                | Образец интактной плазмы крови: сигнал аналита $\leq 20\%$ от сигнала НПКО, сигнал ВС $\leq 5\%$ от сигнала ВС<br>Blank samples: the analyte $\leq 20\%$ LLOQ, the IS response $\leq 5\%$                                             |

**Примечание.** RSD, % – относительное стандартное отклонение. E, % – относительная погрешность.

**Note.** RSD, % – relative standard deviation. E, % – relative error.

### Калибровочная кривая

Был проведен анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением РСР ВС прометази-на до получения в образце концентрации 1,00 нг/мл и смешанных РСР нирматрелвира и ритонавира до концентраций нирматрелвира в диапазоне 50,00–10 000,00 нг/мл и ритонавира в диапазоне 5,00–

1000,00 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика нирматрелвира к площади пика прометазина от отношения концентрации нирматрелвира к концентрации прометазина в плазме крови, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика ритонавира к площади пика прометазина от отношения концентрации ритонавира к концентрации прометазина в плазме крови. Данные графики имели линейный вид. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (*R*) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–4 приведены в таблице 7.

Точность и прецизионность

Были проанализированы калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2 и Н (см. таблица 2). Анализ проводили в рамках четырех последовательностей по пять вводов образца для каждого уровня концентрации нирматрелвира и ритонавира. Исследование проводили внутри циклов и между циклами в течение 1–4 последовательностей. Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной

погрешности (*E*, %) на уровне между циклами использовали данные, полученные в течение 1–3 последовательностей (между циклами, *n* = 15), а также в течение 1–4 последовательностей (между циклами, *n* = 20). Данные представлены в таблице 8.

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека составили 50,00 нг/мл для нирматрелвира и 5,00 нг/мл для ритонавира. Хроматограмма плазмы крови с содержанием нирматрелвира и ритонавира на уровне НПКО представлена на рисунке 5.

Степень извлечения

Были проанализированы по три образца, приготовленные из интактной плазмы крови, гемолизной и гиперлипидемической интактной без влияния степени извлечения (СИ) на уровнях L, M1, M2 и Н (см. таблица 2), а также образцы контроля качества, приготовленные на различных видах биологической интактной матрицы для оценки СИ. Среднее значение

Таблица 7. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

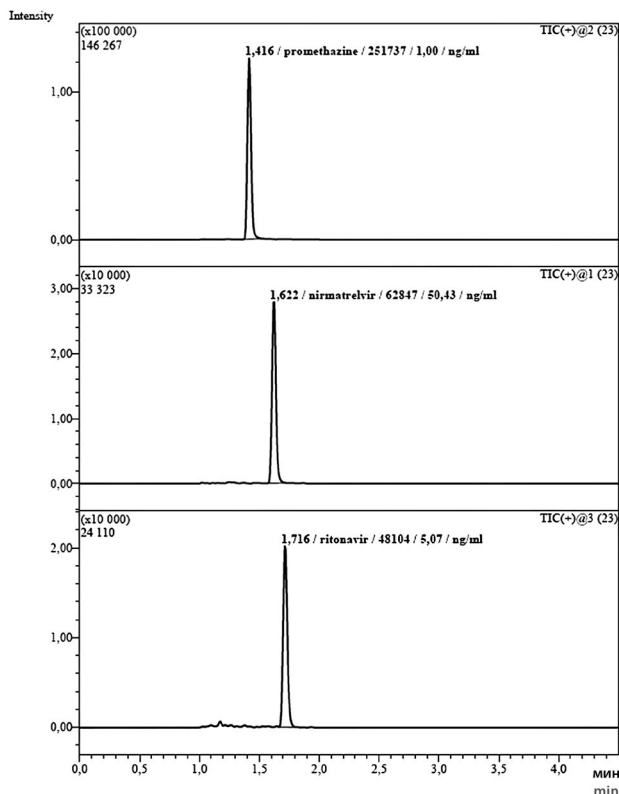
Table 7. Calibration equation and correlation coefficients

| № | НИРМ<br>NIRM                          |           | РИТ<br>RIT                          |           |
|---|---------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
|   | Уравнение<br>Calibration equation     | R         | Уравнение<br>Calibration equation   | R         |
| 1 | $y = 0,00477758 \cdot x + 0,00871658$ | 0,9974542 | $y = 0,0228336 \cdot x + 0,0752374$ | 0,9972169 |
| 2 | $y = 0,00502899 \cdot x + 0,0104544$  | 0,9985304 | $y = 0,0456889 \cdot x + 0,225216$  | 0,9958858 |
| 3 | $y = 0,00424893 \cdot x + 0,00205931$ | 0,9984737 | $y = 0,0320798 \cdot x + 0,103687$  | 0,9991287 |
| 4 | $y = 0,00341493 \cdot x + 0,0257467$  | 0,9988095 | $y = 0,0114315 \cdot x + 0,0427539$ | 0,9977584 |

Таблица 8. Точность и прецизионность методики определения нирматрелвира и ритонавира

Table 8. Accuracy and precision of nirmatrelvir and ritonavir determination

| Введено<br>(мкг/мл)<br>Injected<br>(µg/mL) | RSD, %                    |                       |                       |                       |                            |               | E, %                      |                       |                       |                       |                            |               |
|--------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|---------------|
|                                            | Внутри цикла<br>Inter-day |                       |                       |                       | Между циклами<br>Intra-day |               | Внутри цикла<br>Inter-day |                       |                       |                       | Между циклами<br>Intra-day |               |
|                                            | <i>n</i> = 5<br>(№ 1)     | <i>n</i> = 5<br>(№ 2) | <i>n</i> = 5<br>(№ 3) | <i>n</i> = 5<br>(№ 4) | <i>n</i> = 15              | <i>n</i> = 20 | <i>n</i> = 5<br>(№ 1)     | <i>n</i> = 5<br>(№ 2) | <i>n</i> = 5<br>(№ 3) | <i>n</i> = 5<br>(№ 4) | <i>n</i> = 15              | <i>n</i> = 20 |
|                                            | НИРМ<br>NIRM              |                       |                       |                       |                            |               |                           |                       |                       |                       |                            |               |
| 50,00                                      | 3,54                      | 8,39                  | 4,31                  | 6,17                  | 6,00                       | 6,17          | -4,71                     | -10,91                | -7,69                 | -9,22                 | 14,46                      | -9,22         |
| 150,00                                     | 4,75                      | 2,95                  | 2,54                  | 6,61                  | 6,88                       | 6,61          | -4,60                     | -9,37                 | 4,32                  | -4,40                 | 6,58                       | -4,40         |
| 2000,00                                    | 3,46                      | 2,06                  | 2,08                  | 8,33                  | 5,51                       | 8,33          | -4,75                     | -2,82                 | -13,07                | -3,13                 | 10,69                      | -3,13         |
| 4000,00                                    | 3,98                      | 2,80                  | 1,82                  | 7,96                  | 8,74                       | 7,96          | 1,61                      | -14,57                | 1,92                  | -2,81                 | 7,67                       | -2,81         |
| 8000,00                                    | 2,50                      | 2,27                  | 2,76                  | 7,22                  | 7,46                       | 7,22          | -1,49                     | -14,51                | -0,18                 | -3,67                 | 6,35                       | -3,67         |
|                                            | РИТ<br>RIT                |                       |                       |                       |                            |               |                           |                       |                       |                       |                            |               |
| 5,00                                       | 4,51                      | 11,96                 | 8,49                  | 13,44                 | -7,77                      | 13,44         | 13,84                     | -6,28                 | -13,36                | -3,70                 | -1,93                      | -3,70         |
| 15,00                                      | 3,83                      | 7,40                  | 2,33                  | 7,47                  | -3,22                      | 7,47          | 8,68                      | -2,44                 | 0,43                  | -0,08                 | 2,22                       | -0,08         |
| 200,00                                     | 1,04                      | 5,09                  | 1,61                  | 10,38                 | -6,88                      | 10,38         | 12,76                     | 2,71                  | -11,74                | 3,96                  | 1,24                       | 3,96          |
| 450,00                                     | 3,58                      | 4,24                  | 3,00                  | 7,07                  | -3,68                      | 7,07          | 14,23                     | -1,68                 | 0,99                  | 3,84                  | 4,51                       | 3,84          |
| 800,00                                     | 3,39                      | 2,80                  | 3,66                  | 5,96                  | -5,40                      | 5,96          | 7,75                      | -1,15                 | -5,16                 | 1,22                  | 0,48                       | 1,22          |



**Рисунок 5.** Хроматограмма образца плазмы крови (НИРМ 50,00 нг/мл, РИТ 5,00 нг/мл)

**Figure 5.** Chromatogram of plasma sample (NIRM 50.00 ng/mL, RIT 5.00 ng/mL)

СИ нирматрелвира из различных видов интактных матриц составляет 93,85 %, ритонавира – 108,51 %. RSD рассчитанных значений СИ нирматрелвира из различных видов интактных матриц составляет 11,04 %, ритонавира – 14,64 % (таблица 9).

**Таблица 9.** Оценка степени извлечения нирматрелвира и ритонавира на уровнях L, M1, M2 и H из различных видов биологической матрицы

**Table 9.** Calculation of nirmatrelvir and ritonavir recovery at levels L, M1, M2, H

| Биологическая матрица<br>Biological matrix               | СИ НИРМ. %<br>Recovery NIRM, % |        |        |        | СИ РИТ, %<br>Recovery RIT, % |        |        |        |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|--------|
|                                                          | L                              | M1     | M2     | H      | L                            | M1     | M2     | H      |
| Интактная плазма крови<br>Blank plasma                   | 86,10                          | 73,60  | 102,49 | 80,51  | 83,77                        | 117,96 | 123,33 | 76,04  |
|                                                          | 85,51                          | 74,87  | 100,13 | 93,18  | 87,48                        | 118,53 | 123,03 | 89,66  |
|                                                          | 91,20                          | 73,61  | 109,31 | 91,72  | 92,75                        | 126,56 | 135,12 | 89,80  |
| Гемолизная плазма крови<br>Hemolyzed blank plasma        | 96,99                          | 90,96  | 80,22  | 113,04 | 98,72                        | 129,86 | 107,27 | 124,46 |
|                                                          | 88,04                          | 98,16  | 82,05  | 105,03 | 87,55                        | 132,14 | 105,21 | 118,66 |
|                                                          | 87,51                          | 92,60  | 90,58  | 106,67 | 83,20                        | 122,07 | 114,86 | 117,33 |
| Гиперлипидемическая плазма крови<br>Lipemic blank plasma | 95,96                          | 98,21  | 98,71  | 103,32 | 110,55                       | 108,96 | 120,82 | 103,36 |
|                                                          | 99,93                          | 107,23 | 89,55  | 94,42  | 106,70                       | 118,63 | 106,27 | 94,57  |
|                                                          | 94,43                          | 114,49 | 94,10  | 94,22  | 98,25                        | 131,23 | 104,67 | 97,01  |
| Среднее<br>Average                                       | 93,85                          |        |        |        | 108,51                       |        |        |        |
| SD                                                       | 10,36                          |        |        |        | 15,89                        |        |        |        |
| RSD                                                      | 11,04                          |        |        |        | 14,64                        |        |        |        |

## Эффект матрицы

Для оценки влияния биологической матрицы на количественное определение нирматрелвира и ритонавира был проведен анализ образцов с добавлением смешанных РСР 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 нирматрелвира и ритонавира (см. таблица 2). Для ВС прометазина эффект матрицы был рассчитан на уровне 1,00 нг/мл. По полученным данным был рассчитан фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту (таблица 10).

## Стабильность

Были проанализированы по три образца для оценки настольной и постпрепаративной краткосрочной стабильности, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, стабильности ИСР и РСР (при хранении в течение 17 дней при температуре –50 °С до –35 °С), долгосрочной стабильности аналита на уровнях L и H (см. таблица 2). Долгосрочная стабильность была оценена дважды: проводилась промежуточная оценка при хранении в течение 17 дней при температуре от –50 °С до –35 °С, а также дополнительная оценка при хранении в течение 38 дней при температуре от –50 °С до –35 °С, поскольку минимальный срок для оценки данного вида стабильности должен соответствовать периоду хранения образцов от начала отбора в клиническом центре до момента завершения анализа последней пробы в рамках аналитического этапа исследования. Результаты оценки стабильности представлены в таблице 11.

Таблица 10. Расчет фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта  
Table 10. Calculation of IS-normalized matrix factors of nirmatrelvir and ritonavir

|                    | Интakтная плазма<br>крови<br>Blank plasma |      | Гемолизная плазма<br>крови<br>Hemolyzed blank plasma |       | Гиперлипидемическая<br>плазма<br>Lipemic blank plasma |       |
|--------------------|-------------------------------------------|------|------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------|-------|
|                    | Нормализованный Mf<br>Normalized Mf       |      |                                                      |       |                                                       |       |
|                    | L                                         | H    | L                                                    | H     | L                                                     | H     |
| НИРМ<br>NIRM       |                                           |      |                                                      |       |                                                       |       |
| Среднее<br>Average | 1,20                                      | 0,95 | 1,16                                                 | 0,81  | 1,09                                                  | 0,81  |
| RSD, %             | 4,24                                      | 9,81 | 4,16                                                 | 5,37  | 3,55                                                  | 5,53  |
| РИТ<br>RIT         |                                           |      |                                                      |       |                                                       |       |
| Среднее<br>Average | 1,95                                      | 1,44 | 1,67                                                 | 1,18  | 1,32                                                  | 1,17  |
| RSD, %             | 4,22                                      | 5,39 | 9,95                                                 | 14,12 | 7,57                                                  | 11,09 |

Перенос пробы

В рамках валидационных циклов № 1–3 проводился последовательный анализ калибровочных образцов на уровне 8 (см. таблица 2) и образцов интактной плазмы крови. Результаты оценки переноса пробы представлены в таблице 12.

Таблица 11. Оценка стабильности  
Table 11. Stability assessment

| Вид стабильности<br>Type of stability                                      | Срок и условия хранения образцов<br>Time and storage conditions                                                                   | Среднее значение E, %<br>Average value of E, % |        |            |       |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------|------------|-------|
|                                                                            |                                                                                                                                   | НИРМ<br>NIRM                                   |        | РИТ<br>RIT |       |
|                                                                            |                                                                                                                                   | L                                              | H      | L          | H     |
| «Настольная» стабильность<br>Bench-top stability                           | Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °C<br>Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C          | 4,63                                           | 8,56   | 13,73      | 12,70 |
| «Постпрепаративная» стабильность<br>Postpreparative stability              | 24 часа при температуре 4 °C<br>24 hours at 4 °C                                                                                  | –10,35                                         | –11,45 | 9,62       | –1,44 |
| Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке<br>Freeze-thaw stability | 36 часа при температуре –42,5 ± 7,5 °C и 6 часов при температуре 20 ± 5 °C<br>36 hours at –42.5 ± 7.5 °C and 6 hours at 20 ± 5 °C | 2,67                                           | 3,23   | 3,23       | –2,57 |
| Долгосрочная стабильность аналита в матрице<br>Long-term stability         | 17 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C<br>17 days at –42.5 ± 7.5 °C                                                               | 3,16                                           | 4,69   | 2,67       | 2,65  |
|                                                                            | 38 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C<br>38 days at –42.5 ± 7.5 °C                                                               | 1,10                                           | 4,89   | –2,47      | –2,06 |
| Стабильность ИСП<br>Stock solution stability                               | 17 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C<br>17 days at –42.5 ± 7.5 °C                                                               | 0,37                                           | 4,29   | –1,76      | –0,93 |
| Стабильность РСР<br>Work solution stability                                | 17 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C<br>17 days at –42.5 ± 7.5 °C                                                               | –0,01                                          | 5,56   | –2,36      | –2,65 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10000,00 нг/мл для нирматрелвира и ритонавира в диапазоне 5,00–1000,00 нг/мл для ритонавира в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения аналитического этапа исследования с целью изучения фармакокинетических параметров комбинированных препаратов нирматрелвира и ритонавира.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Garg I., Shekhar R., Sheikh A.B., Pal S. Impact of COVID-19 on the changing patterns of respiratory syncytial virus infections. *Infectious Disease Reports*. 2022;14(4):558–568. DOI: 10.3390/idr14040059.

2. Hiremath S., McGuinty M., Argyropoulos C., Brimble K.S., Brown P.A., Chagla Z., Cooper R., Hoar S., Juurlink D., Treleven D., Walsh M. Prescribing nirmatrelvir/ritonavir for COVID-19 in advanced CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2022;17(8):1247–1250. DOI: 10.2215/CJN.05270522.

3. Hung Y.P., Lee J.C., Chiu C.W., Lee C.C., Tsai P.J., Hsu I.L., Ko W.C. Oral Nirmatrelvir/Ritonavir Therapy for COVID-19: The Dawn in the Dark? *Antibiotics*. 2022;11(2):220. DOI: 10.3390/antibiotics11020220.

4. Marzi M., Vakili M.K., Bahmanyar M., Zarenezhad E. Paxlovid: mechanism of action, synthesis, and in silico study. *BioMed Research International*. 2022;2022:7341493. DOI: 10.1155/2022/7341493.

5. Saravolatz L.D., Depcinski S., Sharma M. Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: Oral Coronavirus Disease 2019 Antiviral Drugs. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76(1):165–171. DOI: 10.1093/cid/ciac180.

6. Toussi S.S., Neutel J.M., Navarro J., Preston R.A., Shi H., Kavetska O., LaBadie R.R., Binks M., Chan P.L., Demers N., Corrigan B. Pharmacokinetics of Oral Nirmatrelvir/Ritonavir, a Protease Inhibitor for Treatment of COVID-19, in Subjects With Renal Impair-

Таблица 12. Оценка переноса пробы  
Table 12. Assessment of carry-over effect

| № | Образец<br>Sample                      | Значение площади<br>Area |            |              | Отношение площадей, %<br>Area ratio, % |            |              |
|---|----------------------------------------|--------------------------|------------|--------------|----------------------------------------|------------|--------------|
|   |                                        | НИРМ<br>NIRM             | РИТ<br>RIT | ПРОМ<br>PROM | НИРМ<br>NIRM                           | РИТ<br>RIT | ПРОМ<br>PROM |
| 1 | НПКО<br>LLOQ                           | 65110                    | 56522      | 275624       | –                                      | –          | –            |
|   | Интakтная плазма крови<br>Blank plasma | 0                        | 4358       | 0            | 0,00                                   | 7,71       | 0,00         |
| 2 | НПКО<br>LLOQ                           | 66863                    | 66863      | 312152       | –                                      | –          | –            |
|   | Интakтная плазма крови<br>Blank plasma | 0                        | 1714       | 0            | 0,00                                   | 2,56       | 0,00         |
| 3 | НПКО<br>LLOQ                           | 63158                    | 77307      | 318969       | –                                      | –          | –            |
|   | Интakтная плазма крови<br>Blank plasma | 0                        | 0          | 0            | 0,00                                   | 0,00       | 0,00         |

- ment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;112(4):892–900. DOI: 10.1002/cpt.2688.
- Extance A. Covid-19: What is the evidence for the antiviral Paxlovid? *BMJ*. 2022;377:o1037. DOI: 10.1136/bmj.o1037.
  - Guyon J., Novion M., Fulda V., Ducint D., Molimard M., Couzi L., Kaminski H., Salvo F., Bouchet S. A UPLC-MS/MS Method for Plasma Biological Monitoring of Nirmatrelvir and Ritonavir in the Context of SARS-CoV-2 Infection and Application to a Case. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2022;33(10):1975–1981. DOI: 10.1021/jasms.2c00204.
  - Martens-Lobenhoffer J., Böger C. R., Kielstein J., Bode-Böger S. M. Simultaneous quantification of nirmatrelvir and ritonavir by LC-MS/MS in patients treated for COVID-19. *Journal of Chromatography B*. 2022;1212:123510. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123510.
  - Lingscheid T., Kinzig M., Krüger A., Müller N., Bölke G., Tober-Lau P., Münn F., Kriedemann H., Witzernath M., Sander L. E., Sörgel F. Pharmacokinetics of Nirmatrelvir and Ritonavir in COVID-19 Patients with End-Stage Renal Disease on Intermittent Hemodialysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022;66(11):e01229–e01222. DOI: 10.1128/aac.01229-22.
  - Liu C., Zhu M., Cao L., Boucetta H., Song M., Hang T., Lu Y. Simultaneous determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma using LC-MS/MS and its pharmacokinetic application in healthy Chinese volunteers. *Biomedical Chromatography*. 2022;36(11):e5456. DOI: 10.1002/bmc.5456.
  - Singh R. S., Toussi S. S., Hackman F., Chan P. L., Rao R., Allen R., Van Eyck L., Pawlak S., Kadar E. P., Clark F., Shi H., Anderson A. S., Binks M., Menon S., Nucci G., Bergman A. Innovative Randomized Phase I Study and Dosing Regimen Selection to Accelerate and Inform Pivotal COVID-19 Trial of Nirmatrelvir. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;112(1):101–111. DOI: 10.1002/cpt.2603.