

Разработка и валидация методики количественного определения апиксабана в плазме крови с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС

У. Д. Филонова^{1,2}✉, П. К. Карнакова¹, К. К. Карнакова¹, М. О. Попова¹,
А. А. Попова¹, О. А. Арчакова¹, Т. Н. Комаров^{1,3}, И. Е. Шохин^{1,2}

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

² Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ Контактное лицо: Филонова Ульяна Денисовна. E-mail: u.filonova@cpha.ru

ORCID: У. Д. Филонова – <https://orcid.org/0009-0009-7266-3296>; П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>;

К. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>; М. О. Попова – <https://orcid.org/0009-0008-1688-1902>;

А. А. Попова – <https://orcid.org/0000-0002-3874-8626>; О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;

Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 22.12.2023

Статья принята в печать: 19.02.2024

Статья опубликована: 20.02.2024

Резюме

Введение. Апиксабан – антикоагулянт, применяющийся при ряде тромбоземболических заболеваний и обладающий улучшенным соотношением пользы от приема препарата и рисков развития кровотечения согласно многочисленным клиническим исследованиям. В связи с назначением апиксабана в качестве антитромботической терапии пациентам с COVID-19 наблюдается рост его применения. Таким образом, из-за большого распространения апиксабана и необходимости проведения фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности препаратов апиксабана важно разработать и валидировать простую и чувствительную методику количественного определения апиксабана в плазме крови.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения апиксабана в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для последующего проведения фармакокинетического исследования.

Материалы и методы. Определение апиксабана в плазме крови человека проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС, используя ривароксабан как внутренний стандарт. Пробоподготовка проводилась путем осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А); 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Время анализа: 3,00 мин. Колонка: Shim-pack Velox Biphenyl; 2,7 мкм; 50 × 2,1 мм. Источник ионизации: электроспрей с положительным режимом ионизации. MRM-переходы: 460,15 → 443,10 m/z (апиксабан); 436,05 → 144,95 m/z (ривароксабан).

Результаты и обсуждение. Валидация проводилась согласно действующим требованиям ЕАЭС по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность и прецизионность, нижний предел количественного определения, пригодность стандартных образцов, эффект матрицы, степень извлечения, стабильность, перенос пробы, отсутствие влияния разбавления образцов. Результаты оценки всех параметров соответствовали установленным критериям приемлемости.

Заключение. Подтвержденный аналитический диапазон разработанной и валидированной методики составил 1,00–300,00 нг/мл в плазме крови. Методика определения апиксабана в плазме крови является простой и чувствительной. Данная методика была апробирована во время аналитической части исследования биоэквивалентности и может применяться для других фармакокинетических исследований препаратов апиксабана.

Ключевые слова: антикоагулянты, НОАК, апиксабан, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, COVID-19, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, П. К. Карнакова, У. Д. Филонова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, а также в проведении аналитической части исследования. К. К. Карнакова проводила статистическую обработку данных. М. О. Попова, А. А. Попова отвечали за качество данных и организацию системы менеджмента качества. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Филонова У. Д., Карнакова П. К., Карнакова К. К., Попова М. О., Попова А. А., Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики количественного определения апиксабана в плазме крови с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):224–240. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1684>

Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for Quantification of Apixaban in Human Plasma

Ulyana D. Filonova^{1,2}✉, Polina K. Karnakova¹, Kseniia K. Karnakova¹, Mariia O. Popova¹,
Anna A. Popova¹, Olga A. Archakova¹, Timofey N. Komarov^{1,3}, Igor E. Shohin^{1,2}

© Филонова У. Д., Карнакова П. К., Карнакова К. К., Попова М. О., Попова А. А., Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Шохин И. Е., 2024

© Filonova U. D., Karnakova P. K., Karnakova K. K., Popova M. O., Popova A. A., Archakova O. A., Komarov T. N., Shohin I. E., 2024

¹ LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia

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

³ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Ulyana D. Filonova. E-mail: u.filonova@cpha.ru

ORCID: Ulyana D. Filonova – <https://orcid.org/0009-0009-7266-3296>; Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>;

Kseniia K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>; Mariia O. Popova – <https://orcid.org/0009-0008-1688-1902>;

Anna A. Popova – <https://orcid.org/0000-0002-3874-8626>; Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;

Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 22.12.2023

Revised: 19.02.2024

Published: 20.02.2024

Abstract

Introduction. Apixaban is an anticoagulant used in a number of thromboembolic diseases with an improved benefit-to-risk ratio, according to multiple clinical studies. Due to the prescription of apixaban as antithrombotic therapy in patients with COVID-19, an increase in its use has been observed. Thus, due to the widespread use of apixaban and the need to conduct pharmacokinetic and bioequivalence studies of the drug, it is important to develop and validate a simple and sensitive method for the quantitative determination of apixaban in human blood plasma.

Aim. The aim of the study is to develop and validate a method for the determination of apixaban in human blood plasma using high-performance liquid chromatography with tandem mass selective detection (HPLC-MS/MS) for the subsequent bioanalytical study.

Materials and methods. The determination of apixaban in human plasma was carried out by HPLC-MS/MS with rivaroxaban as an internal standard. The method of protein precipitation with acetonitrile was used as sample preparation. Mobile phase: 0.1 % solution of formic acid in water (eluent A); 0.1 % solution of formic acid in acetonitrile (eluent B). The total run time was 3.00 min. Column: Shim-pack Velox Biphenyl; 2.7 µm; 50 × 2.1 mm. Ionization source: electrospray with positive ionization mode. MRM transitions: 460.15 → 443.10 m/z (apixaban); 436.05 → 144.95 m/z (rivaroxaban).

Results and discussion. The developed method was validated in accordance with the EAEU requirements for the following parameters: selectivity, calibration curve, accuracy and precision, lower limit of quantitation, suitability of standard samples, matrix effect, recovery, stability, carry-over, dilution effects. The parameters met the acceptance criteria.

Conclusion. The confirmed analytical range of the developed and validated method was 1.00–300.00 ng/mL in blood plasma. The method for determining apixaban in blood plasma is simple and sensitive. This method was tested during the analytical part of the bioanalytical study and can be used to conduct other pharmacokinetic studies of apixaban drugs.

Keywords: anticoagulants, DOAC, apixaban, HPLC-MS/MS, validation, COVID-19, 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, Polina K. Karnakova, Ulyana D. Filonova have participated in the development and validation of the bioanalytical method, as well as in conducting the analytical part of the study. Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the data. Maria O. Popova, Anna A. Popova were responsible for data quality and organization of the quality management system. Igor E. Shohin was responsible for the organizational part of the study. All of the above authors participated in the discussion of the results obtained in the form of a scientific discussion.

For citation: Filonova U. D., Karnakova P. K., Karnakova K. K., Popova M. O., Popova A. A., Archakova O. A., Komarov T. N., Shohin I. E. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for quantification of apixaban in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):224–240. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1684>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клинической практике широко используются *антикоагулянты* – препараты, блокирующие реакции плазменного гемостаза. Варфарин и другие антагонисты витамина К являются высокоэффективными оральными антикоагулянтами, но их применение ограничено узким терапевтическим окном, взаимодействием с другими лекарственными средствами и пищей, а также необходимостью постоянного лабораторного контроля и мониторинга расчетного показателя международного нормализованного отношения [1, 2]. Для преодоления данных ограничений с 2004 года началась разработка новых оральных антикоагулянтов (НОАК): апиксабана, ривароксабана, дабигатрана этексилата и эдоксабана [3]. Данные препараты не уступают по эффективности

варфарину, снижают общую смертность, обладают высокой безопасностью, а также позволяют пациентам принимать фиксированные дозы без рутинного терапевтического мониторинга [2, 4, 5].

Несмотря на то что варфарин, зарегистрированный в Российской Федерации в 2001 году, до сих пор остается наиболее часто используемым антикоагулянтом и достаточно широко представлен на фармацевтическом рынке [6], в последнее время НОАК также получили большое распространение в РФ, наблюдается рост их назначений пациентам. На отечественном фармацевтическом рынке по итогам 2018 года лидирующее положение среди НОАК занял ривароксабан, тем не менее, учитывая динамику роста продаж апиксабана, ожидается, что в ближайшее время данный препарат может подняться на первое место [7].

Согласно данным фармакоэкономического анализа, проведенного в 2022 году, применение апиксабана для профилактики развития ишемического инсульта или системной эмболии у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий по сравнению с другими НОАК является экономически более выгодным и требует меньших затрат от системы здравоохранения [8]. Применение апиксабана также имеет большую актуальность в связи с его назначением пациентам с диагностированной коронавирусной инфекцией [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)], вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) [9]. Несмотря на то что вирус SARS-CoV-2 в первую очередь поражает дыхательную систему, у многих пациентов данный вирус вызывает сердечно-сосудистые повреждения и гиперкоагуляцию, проявляющуюся в большинстве случаев венозной тромбоэмболией, включая легочную эмболию (ЛЭ) и тромбоз глубоких вен (ТГВ) [10]. НОАК включены в руководство ВОЗ «Клиническое ведение COVID-19: Руководящие рекомендации» («Clinical management of COVID-19: Living guideline»)¹, а также в методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции² в качестве антитромботической терапии. Согласно имеющимся данным, назначение антикоагулянтной терапии пациентам с COVID-19 улучшает клинические исходы и благоприятно влияет на течение болезни [11–13].

Апиксабан (1-(4-метоксифенил)-7-оксо-6-(4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил)-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-пиразоло[3,4-с]пиримидин-3-карбоксамид) представляет собой структурно новый нейтральный бициклический пиразол. Он является прямым ингибитором фактора Ха, который ингибирует как свободный, так и связанный фактор Ха и не требует наличия антитромбина III для проявления антитромботической активности. Ингибируя фактор Ха, апиксабан снижает образование тромбина и развитие тромбов, не оказывая прямого влияния на агрегацию тромбоцитов, но косвенно ингибируя агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином [14, 15].

Апиксабан одобрен во многих странах для клинического применения при ряде тромбоэмболических заболеваний, применяется для снижения риска инсульта при неклапанной фибрилляции предсер-

дий, тромбопрофилактики после замены тазобедренного или коленного сустава, лечения ТГВ или ЛЭ [16]. Результаты ключевых клинических исследований продемонстрировали, что апиксабан является важной альтернативой существующим антикоагулянтным препаратам, таким как антагонисты витамина К, к которым относится варфарин, и низкомолекулярные гепарины, с улучшенным соотношением пользы от приема препарата и рисков развития кровотечения [16–18].

Таким образом, апиксабан является современным препаратом с высокой эффективностью и доказанной безопасностью [19–23]. В связи с этим для проведения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности препаратов апиксабана важно разработать и валидировать такую методику количественного определения апиксабана в плазме крови, которая соответствовала бы всем нашим требованиям.

В данной статье приводится разработка и валидация новой чувствительной и быстрой методики количественного определения апиксабана в плазме крови человека с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС с использованием градиентного режима элюирования. Данная методика отличается не только короткой продолжительностью анализа и высокой чувствительностью, но также имеет наиболее простой способ пробоподготовки, обеспечивающий оптимальное извлечение действующего вещества, и легкодоступный внутренний стандарт.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В ходе проведения исследования были использованы следующие реактивы: метанол (класс «HPLC gradient grade», ООО ТД «ХИММЕД», Россия), ацетонитрил (класс «HPLC-S Gradient Grade», Biosolve Chimie, Франция; класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия), муравьиная кислота (класс «99–100 %», VWR Chemicals, Франция), вода деминерализованная I класса (система очистки воды (деминерализатор), Hydrolab R5, Польша).

Исходные и рабочие растворы

Исходный стандартный раствор (ИСР) апиксабана готовили, растворяя навеску субстанции стандартного образца (СО) апиксабана (SynZeal Research Private Limited, Индия, количественное содержание 100,00 %) в метаноле до получения в растворе концентрации, составляющей 100 000,00 нг/мл. Рабочие стандартные растворы (РСР) апиксабана готовили разведением ИСР метанолом, достигая необходимых концентраций, соответствующих калибровочным уровням № 1–8 и уровням контроля качества (таблица 1). РСР внутреннего стандарта (BC [internal standard, IS]) ривароксабана готовили, растворяя навеску субстанции СО ривароксабана (KINSY, S.L., Испания, количествен-

¹ Clinical management of COVID-19: living guideline, 18 August 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/2019-nCoV/clinical/2023.2). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Доступно по: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2023.2>. Ссылка активна на 20.12.2023.

² Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023). Доступно по: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V18.pdf. Ссылка активна на 20.12.2023.

ное содержание 100,00 %) в ацетонитриле до достижения в растворе концентрации 100 000,00 нг/мл. ИСР и РСР апиксабана и ривароксабана, а также образцы интактной плазмы крови хранились в морозильной камере при температуре $-42,5 \pm 7,5$ °C.

Таблица 1. Концентрации апиксабана и ривароксабана в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 1. Concentrations of apixaban at calibration levels and quality control samples

Калибровочные образцы Calibration levels		Концентрация апиксабана, нг/мл Apixaban concentration, ng/mL	Концентрация ривароксабана, нг/мл Rivaroxaban concentration, ng/mL
1		1,00	7500,00
2		10,00	7500,00
3		50,00	7500,00
4		100,00	7500,00
5		150,00	7500,00
6		200,00	7500,00
7		250,00	7500,00
8		300,00	7500,00
Образцы контроля качества Quality control samples			
LLOQ	Нижний предел количественного определения (НПКО) Lower limit of quantification (LLOQ)	1,00	7500,00
L	Низкий Low	3,00	7500,00
M1	Средний 1 Middle 1	75,00	7500,00
M2	Средний 2 Middle 2	180,00	7500,00
H	Высокий High	240,00	7500,00

Пробоподготовка

Схема пробоподготовки представлена на рисунке 1. При ее проведении использовались центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, хроматографические виалы, которые по окончании пробоподготовки помещались в автосамплер хроматографа.

Хроматографическое разделение и детектирование

Для хроматографического разделения был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera XR (Shimadzu Corporation, Япония). Для масс-спектрометрического детектирования использовался tandemный масс-селективный детектор с тройным квадруполем LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Хроматограф был оборудован градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, крапом переключения линии потока высокого давления. Первичные данные были обработаны с помощью программного обеспечения LabSolutions ver. 5.91 (Shimadzu Corporation, Япония).

Для хроматографического разделения использовалась колонка Shim-pack Velox Biphenyl, 2,7 мкм, 50 × 2,1 мм и предколонка Velox EXP Guard Biphenyl, 2,7 мкм, 2,1 × 5,0 мм. В термостате колонок поддерживалась температура на уровне 40 °C. Был выбран градиентный режим элюирования. В качестве подвижной фазы были использованы следующие элюенты:

- Элюент А: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему).
- Элюент В: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).

Градиент по составу подвижной фазы и скорость ее потока приведены в таблице 2.

Таблица 2. Состав подвижной фазы и скорость потока

Table 2. Mobile phase composition and flow rate

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока, мл/мин Flow rate, mL/min
0,00	80,00	20,00	1,00
0,45	20,00	80,00	
1,10	13,00	87,00	
1,20	0,00	100,00	
1,60	0,00	100,00	
1,61	80,00	20,00	
3,00	80,00	20,00	

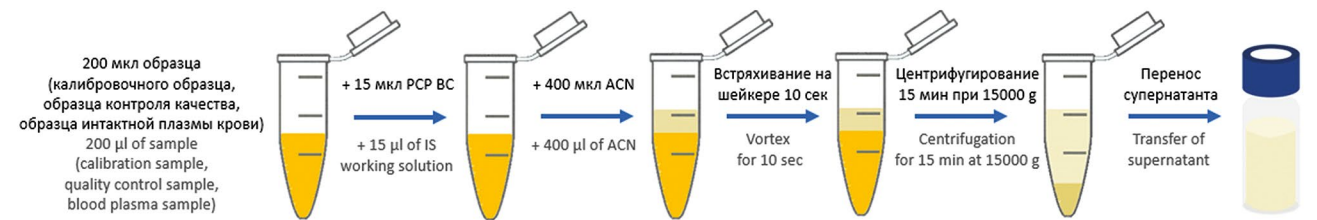


Рисунок 1. Схема пробоподготовки

Figure 1. Sample preparation

Объем вводимой пробы составил 10 мкл. Общее время регистрации хроматограммы: 0,00–3,00 мин. Время удерживания апиксабана составило около 0,9 мин, время удерживания ривароксабана – около 0,9 мин.

Для масс-спектрометрического детектирования был выбран источник ионизации электроспрей (electrospray ionization, ESI). Ионизация проводилась в положительном режиме. Детектирование проводилось путем мониторинга MRM-переходов (Multiple-Reaction Monitoring). Были подобраны следующие MRM-переходы: 460,15 → 443,10 m/z (апиксабан), 436,05 → 144,95 m/z (ривароксабан). Параметры источника ионизации: осушающий газ 20 л/мин, распыляющий газ 3 л/мин, линия десольватации 250 °C, блок нагрева 400 °C, напряжение на игле ESI +4,9 кВ.

Валидация аналитической методики

Для валидации биоаналитической методики за основу были взяты правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза¹, а также руководств EMA² и FDA³, которые включали рассмотренные далее валидационные параметры.

Селективность

Было проанализировано по шесть образцов интактной плазмы крови (ИПК), гиперлипидемической интактной плазмы крови (ГЛИПК), гемолизной интактной плазмы крови (ГИПК). Также были проанализированы образцы на уровне LLOQ для ИПК, ГЛИПК и ГИПК. Сигнал аналита и ВС не должен превышать 20 % от сигнала аналита на уровне LLOQ и 5 % от сигнала ВС.

Калибровочная кривая

Калибровочная кривая включала уровни № 1–8 в аналитическом диапазоне концентраций 1,00–300,00 нг/мл (см. таблицу 1). Величины относительной погрешности (E, %) для оценки точности должны находиться в диапазоне значений от –20 до 20 % для концентрации на уровне LLOQ и от –15 до 15 % для остальных точек. Данному критерию приемле-

мости должны соответствовать не менее 75 % калибровочных образцов в не менее чем шести различных концентрациях.

Точность и прецизионность

Был проведен анализ образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 1). Анализ проводился в рамках пяти последовательных циклов по пять вводов образца для каждого уровня концентраций аналита. Исследование проводилось в течение первой – пятой последовательностей, как внутри, так и между циклами.

Рассчитанные значения относительной погрешности (E, %) для оценки точности должны находиться в пределах от –20 до 20 % для концентрации на уровне LLOQ и от –15 до 15 % для остальных точек. Для оценки прецизионности RSD не должно превышать 20 % для концентрации на уровне LLOQ, 15 % для концентраций остальных точек.

Нижний предел количественного определения

На основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности оценивался нижний предел количественного определения методики как минимальная концентрация аналита в плазме крови, которую можно количественно определить в аналитическом диапазоне со значениями RSD и E, не превышающими 20%.

Пригодность СО

Проводили анализ образцов ИПК с добавлением раствора ВС без аналита, для которых сигнал аналита не должен превышать 20 % от сигнала LLOQ, и образца ИПК с добавлением рабочего раствора аналита № 8 без ВС, для которого сигнал ВС не должен превышать 5 % от сигнала ВС. Также были проанализированы образцы на уровне LLOQ.

Эффект матрицы

Анализировали по шесть образцов с добавлением рабочих стандартных растворов аналита и стандартного раствора ВС без влияния биологической матрицы и по шесть образцов, приготовленных на ИПК, ГЛИПК и ГИПК, не учитывая влияние степени извлечения анализируемых веществ и ВС.

Степень извлечения

Было проанализировано по три образца для уровней L, M1, M2 и H, приготовленных из ИПК, ГИПК и ГЛИПК без влияния степени извлечения и по три соответствующих образца с учетом влияния степени извлечения. RSD степени извлечения аналита из биологических матриц не должно превышать 15 %.

¹ Совет Евразийской экономической комиссии решение 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 20.12.2023.

² European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/> Accessed: 20.12.2023.

³ Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/> Accessed: 20.12.2023.

Стабильность

Было проанализировано по пять образцов для оценки каждого вида стабильности на уровнях L и H. Полученные величины относительной погрешности должны укладываться в диапазон значений от –15 до 15 %.

Перенос пробы

Последовательно анализировались калибровочный образец № 8 с максимальной концентрацией и образцы интактной плазмы крови. Сигнал аналита в образцах интактной плазмы крови не должен превышать 20 % от сигнала на уровне LLOQ, сигнал ВС образца не должен превышать 5 % от сигнала ВС.

Отсутствие влияния разбавления образцов

Были проанализированы образцы плазмы крови с разбавлением в два раза интактной плазмой крови до получения концентраций, соответствующих уровням L и H. Для полученных значений концентраций величины RSD и E не должны превышать 15 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Обзор литературных данных показывает, что существует несколько методов определения апиксабана с использованием предпочтительно высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДМД) [high performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD)], высокоэффективной жидкост-

ной хроматографии с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with UV-detection (HPLC-UV)] и сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)] (таблица 3).

В качестве пробоподготовки для улучшения экстракции аналита из биологических матриц часто использовали трудозатратные способы, такие как твердофазная экстракция (ТФЭ) [26, 29] и жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) [27], при этом данные методики обладали достаточно низкой чувствительностью. В некоторых методиках использовали более быстрый и простой способ пробоподготовки с помощью осаждения белков плазмы крови различными органическими растворителями, метанолом или ацетонитрилом (см. таблицу 3) [9, 24, 25, 28].

По результатам проведенного анализа методик количественного определения апиксабана, представленных в литературных источниках, мы не обнаружили методик одновременно с простым способом пробоподготовки с помощью осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом и высокой чувствительностью, а также коротким временем анализа и доступным внутренним стандартом. На основании этого был сделан вывод о необходимости самостоятельной разработки и валидации методики, отвечающей данным требованиям.

Предпочтительным методом исследования был выбран ВЭЖХ-МС/МС, как один из наиболее чувствительных и селективных методов количественного определения апиксабана в плазме крови человека. В качестве ВС для апиксабана был выбран ривароксабан. Данное вещество имеет схожую с апиксабаном химическую структуру (рисунок 2) и близкие физико-химические характеристики (таблица 4).

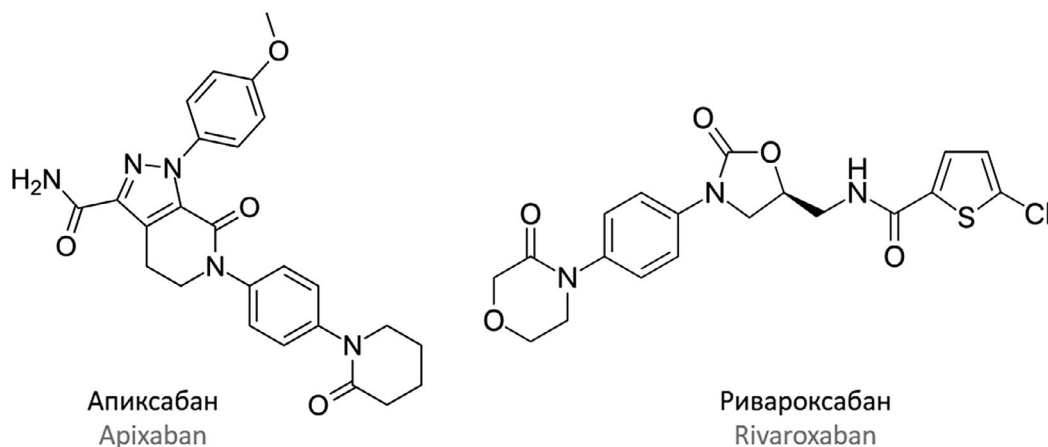


Рисунок 2. Молекулярная формула апиксабана и ривароксабана

Figure 2. Molecular formulas of apixaban and rivaroxaban

Таблица 3. Биоаналитические методики количественного определения апиксабана
Table 3. Bioanalytical methods of quantitative determination of apixaban

Аналитический метод Analytical method	Источник ионизации; ионизация (+/-), если применимо Ionization source; ionization (+/-) if applicable	Анализируемый образец Analysed sample	Пробоподготовка Sample preparation	Внутренний стандарт Internal standard	Аналитический диапазон Analytical range	Время анализа, мин Time of analysis, min	Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	Карбамазепин Carbamazepine	3,00–1000,00 нг/мл 3,00–1000,00 ng/mL	5,5	[9]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation with methanol	Апиксабан-d3 Apixaban-d3	1,00–500,00 нг/мл 1,00–500,00 ng/mL	3	[24]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение белков метанолом Protein precipitation with methanol	Прометазин Promethazine	1,00–1000,00 нг/мл 1,00–1000,00 ng/mL	4,5	[25]
ВЭЖХ-ДМД HPLC-DAD	–	Плазма человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	Хлорамфеникол Chloramphenicol	17,00–5280,00 нг/мл 17,00–5280,00 ng/mL	6	[26]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	–	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	Ривароксабан Rivaroxaban	10,00–500,00 нг/мл 10,00–500,00 ng/mL	7,6	[27]
СВЭЖХ-МС/МС UHPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом с 1%-й муравьиной кислотой Protein precipitation with acetonitrile with 1 % formic acid	Апиксабан- ¹³ Cd ₇ Apixaban- ¹³ Cd ₇	5,00–800,00 нмоль/л 5,00–800,00 nmol/L	3	[28]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	Апиксабан- ¹³ CD ₃ Apixaban- ¹³ CD ₃	1,00–500,00 нг/мл 1,00–500,00 ng/mL	70	[29]

Таблица 4. Физико-химические свойства апиксабана и ривароксабана

Table 4. Chemical and physical characteristics of apixaban and rivaroxaban

	pKa	logP	Молекулярная масса Molecular weight
Апиксабан ¹ Apixaban ¹	13,07	2,22	459,497
Ривароксабан ² Rivaroxaban ²	13,60	1,74	435,881

Примечание. ¹ Apixaban. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06605>. Accessed: 20.12.2023.

² Rivaroxaban. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06228>. Accessed: 20.12.2023.

Note. ¹ Apixaban. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06605>. Accessed: 20.12.2023.

² Rivaroxaban. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06228>. Accessed: 20.12.2023.

При разработке методики были подобраны такие условия масс-спектрометрического детектирования, которые позволяют получить пики апиксабана и ривароксабана с наибольшей интенсивностью. Был проведен анализ дочерних ионов, получаемых при различных энергиях соударения. Для каждого из веществ было получено несколько MRM-переходов, далее были выбраны наиболее интенсивные MRM-переходы: 460,15 → 443,10 m/z (апиксабан); 436,05 → 144,95 m/z (ривароксабан). Наибольшая интенсивность была получена при напряжении на игле ESI +4,9 кВ. Автооптимизация и подбор напряжений на линии десольватации и предварительном квадруполе Q-аггау помогли повысить интенсивность сигналов в несколько раз.

Использовались условия хроматографического разделения, позволяющие получить пики апиксаба-

на и ривароксабана с оптимальными хроматографическими параметрами. Для хроматографического разделения была выбрана колонка Shim-pack Velox Biphenyl (2,7 мкм; 50 × 2,1 мм). В качестве элюентов подвижной фазы были выбраны 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А, по объему) и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В, по объему). Благодаря выбранному градиенту подвижной фазы и скорости потока удалось добиться формы пиков, приближенной к форме гауссовой кривой.

Для экстракции апиксабана из плазмы крови был выбран наиболее простой способ пробоподготовки: осаждение белков плазмы крови ацетонитрилом в соотношении 1:2. Выбор ацетонитрила в качестве осадителя обоснован тем, что при его использовании удается достичь наиболее полного осаждения белков плазмы крови и получить оптимальную форму хроматографических пиков. Также ацетонитрил в качестве осадителя имеет преимущество перед метанолом, так как при его использовании не требуются особые условия хранения проб в автосамплере хроматографа, что позволяет увеличить срок «пост-препаративной» стабильности.

Валидация методики

Селективность

Сигналы апиксабана и ривароксабана на образцах плазмы крови не превышали 20 % от сигнала LLOQ и 5 % от сигнала ВС, что соответствует критериям приемлемости. На рисунке 3 представлена хроматограмма образца интактной плазмы крови человека.

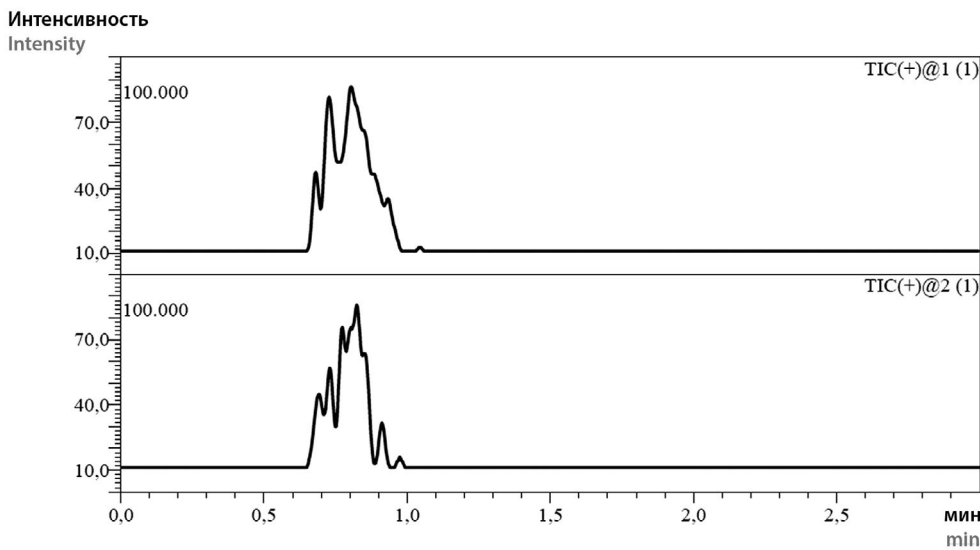


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 3. Chromatogram of blank human plasma sample

Калибровочная кривая

На основе полученных данных были построены графики калибровочных кривых в координатах «отношение площади пика апиксабана к площади пика ривароксабана» и «отношение концентрации апиксабана к концентрации ривароксабана в плазме крови». Все калибровочные графики имели линейный вид. Калибровочный график одного из циклов приведен на рисунке 4. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (*r*) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–5 приведены в таблице 5. Полученные коэффициенты корреляции соответствовали критериям приемлемости и составляли более 0,99. Хроматограмма калибровоч-

ного образца на уровне 8 (см. таблицу 1) представлена на рисунке 5.

Таблица 5. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

Цикл Cycle	Уравнение калибровочной кривой Calibration equation	Коэффициент корреляции (<i>r</i>) Correlation coefficient (<i>r</i>)
1	$y = 54,0977 \cdot x + 0,00293715$	0,9983996
2	$y = 54,0349 \cdot x + 0,00257416$	0,9990636
3	$y = 53,3817 \cdot x + 0,00257242$	0,9985084
4	$y = 44,1182 \cdot x + 0,000185783$	0,9978233
5	$y = 39,1754 \cdot x + 0,00152476$	0,9966636

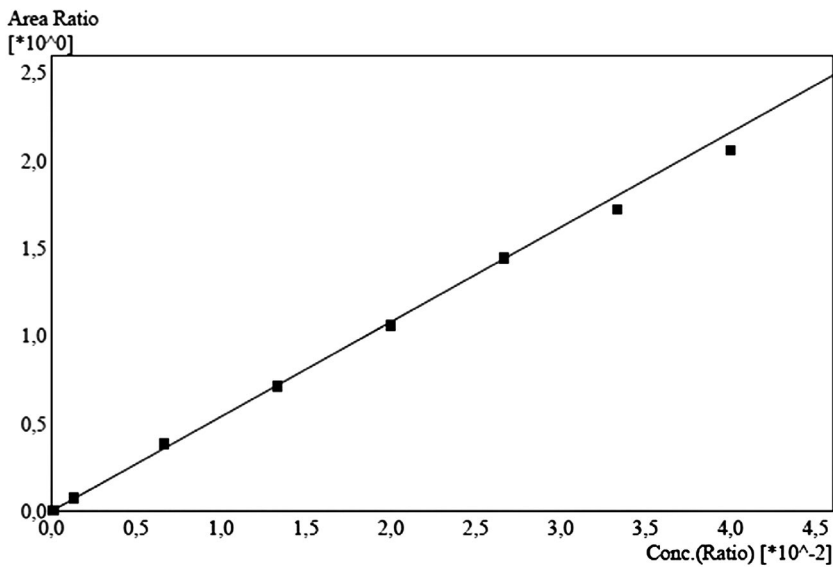


Рисунок 4. Калибровочный график

Figure 4. Calibration curve

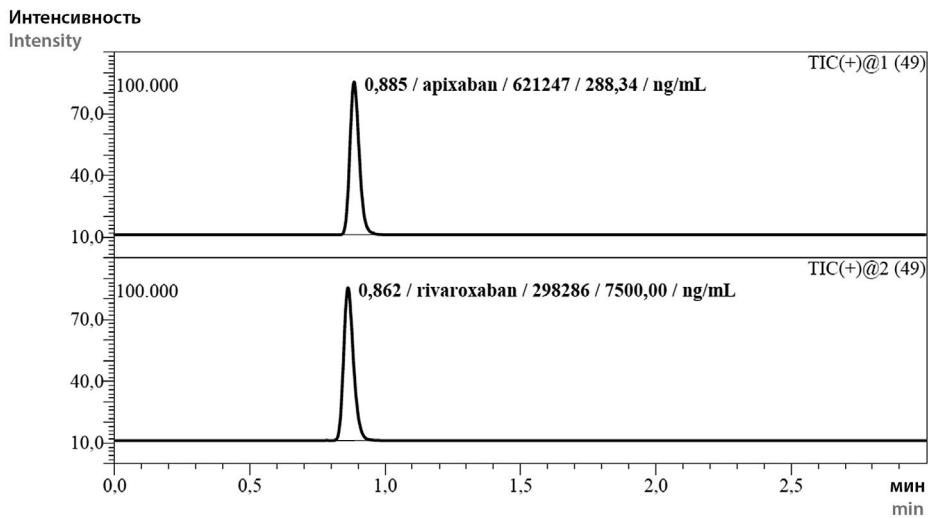


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови на уровне 8

Figure 5. Chromatogram of plasma sample at level 8

Точность и прецизионность

Рассчитанные значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности для оценки прецизионности и точности соответствуют критериям приемлемости. Данные о точности и прецизионности между валидационными циклами № 1–5 представлены в таблице 6.

Таблица 6. Точность и прецизионность между циклами № 1–5 (n = 25)

Table 6. Intra-day accuracy and precision in cycles № 1–5 (n = 25)

Образец Sample	Введено (нг/мл) Injected (ng/mL)	Среднее Average	RSD, %	E, %
LLOQ	1,00	0,97	12,39	–3,44
L	3,00	2,96	7,02	–1,31
M1	75,00	75,78	5,33	1,05
M2	180,00	185,02	8,61	2,79
H	240,00	240,20	6,99	0,08

Нижний предел количественного определения

На рисунке 6 приведена хроматограмма плазмы крови с содержанием апиксабана на уровне нижнего предела количественного определения, который составил 1,00 нг/мл.

Пригодность СО

На проанализированном образце, приготовленном без добавления раствора аналита, сигнал апиксабана не превышал 20 % от сигнала LLOQ. На образце, приготовленном без ВС, сигнал ривароксабана не превышал 5 % от сигнала ВС. Подтверждено отсутствие влияния внутреннего стандарта и его примесей на анализируемое вещество.

Эффект матрицы

Была проведена оценка эффекта матрицы на уровнях L и H. Результаты этой оценки приведены в таблице 7. Для ВС ривароксабана влияние матрицы

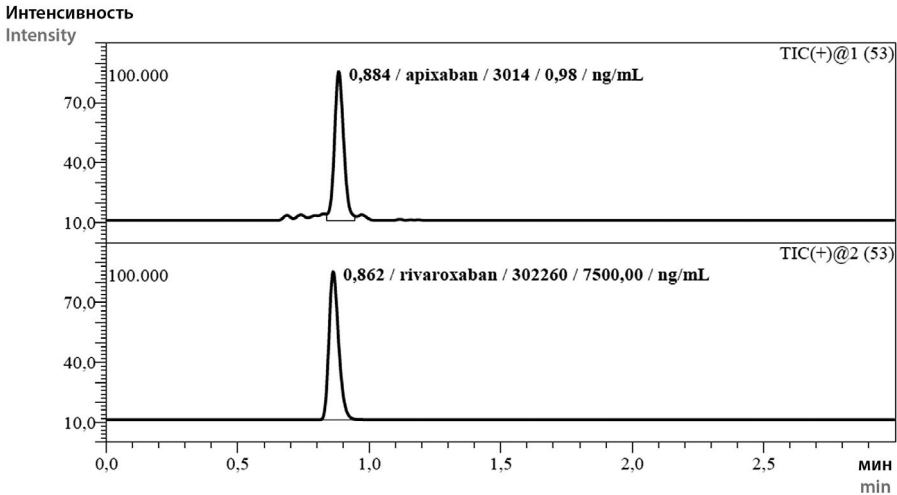


Рисунок 6. Хроматограмма образца плазмы крови на уровне НПКО

Figure 6. Chromatogram of LLOQ plasma sample

Таблица 7. Расчет фактора матрицы, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 7. Calculation of IS-normalized matrix factors

Уровень Level	L			H		
Биологическая матрица Biological matrix	ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma	ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma
Нормализованный Mf Normalized Mf	0,90	0,86	0,91	0,87	0,79	0,83
	0,76	0,82	0,80	0,88	0,82	0,79
	0,85	1,01	0,94	0,84	0,84	0,83
	0,75	0,77	0,75	0,76	0,82	0,81
	0,74	0,71	0,80	0,82	0,82	0,81
	0,82	0,83	0,78	0,78	0,90	0,87
Среднее Average	0,82			0,83		
RSD, %	9,53			4,44		

было определено на уровне 7500,00 нг/мл. Для рассчитанных значений фактора матрицы, нормализованного по ВС, было определено RSD, величина которого не превысила 15 %.

Степень извлечения

Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения апиксабана составило 8,14 %, что не превышает 15 % и соответствует критериям приемлемости. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8. Оценка степени извлечения апиксабана

Table 8. Calculation of apixaban recovery

Образец Sample		Биологическая матрица Biological matrix		
		ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma
Степень извлечения апиксабана, % Recovery of apixaban, %	L	108,38	99,19	90,80
		108,92	86,24	100,89
		102,84	82,13	89,64
	M1	73,05	91,58	92,09
		79,31	82,85	93,30
		83,68	80,99	96,79
	M2	90,54	86,92	96,79
		88,99	95,55	91,43
		91,68	94,44	94,38
	H	87,53	90,01	91,08
		87,54	89,04	95,25
		87,20	89,42	95,45
Среднее Average		91,28		
RSD, %		8,14		

Стабильность

Стабильность апиксабана оценивалась в различных условиях, результаты этой оценки представлены в таблице 9. Полученные величины относительной погрешности соответствуют критериям приемлемости.

Перенос пробы

На образцах интактной плазмы крови сигнал апиксабана не превышал 20 % от сигнала LLOQ, сигнал ВС не превышал 5 % от сигнала ВС. Результаты оценки переноса пробы представлены в таблице 10.

Отсутствие влияния разбавления образцов

Полученные величины RSD для оценки прецизионности и Е для оценки точности соответствовали критериям приемлемости. При получении в рамках аналитического этапа концентраций апиксабана, превышающих значения высшего предела количественного определения, есть возможность разбавления образцов в 2 раза. Данные приведены в таблице 11.

Применение разработанной методики

Данная разработанная и валидированная методика может применяться для фармакокинетических исследований препаратов апиксабана. На основе данной методики был успешно проведен аналитический этап исследования биоэквивалентности нового отечественного препарата апиксабана. Пример хроматограммы образца плазмы крови добровольца, участвующего в данном исследовании, представлен на рисунке 7.

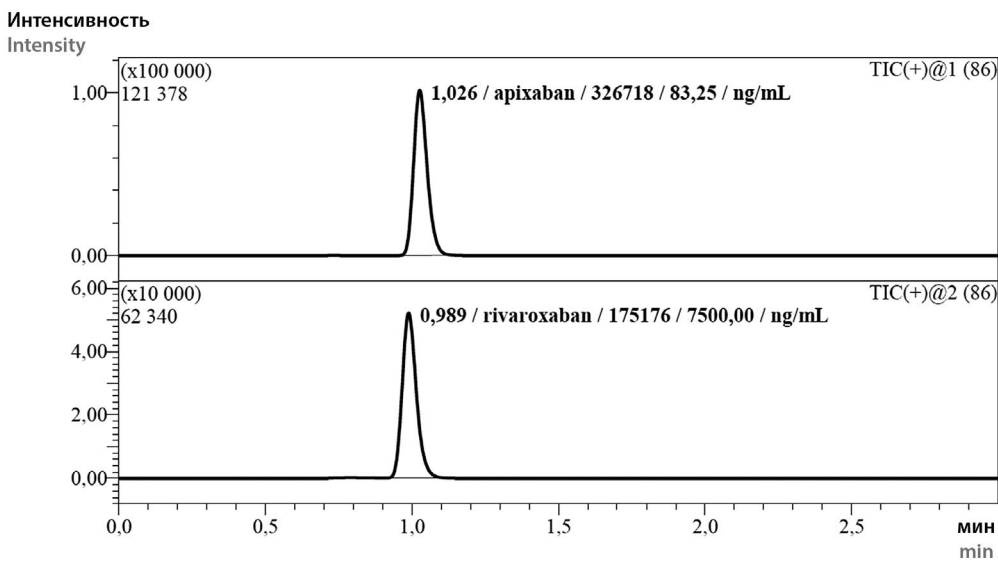


Рисунок 7. Хроматограмма образца плазмы крови добровольца

Figure 7. Chromatogram of volunteer plasma sample

Таблица 9. Оценка стабильности аписабана
Table 9. Stability assessment of apixaban

Вид стабильности Type of stability	«Настольная» Bench-top	«Постпрепаративная» Postpreparative	При пятикратной заморозке – разморозке Freeze-thaw	ИСП Stock solution	РСП Work solution	Долгосрочная 1 Long-term 1		Долгосрочная 2 Long-term 2	
						при -20 ± 5 °C at -20 ± 5 °C	при -75 ± 10 °C at -75 ± 10 °C	при -20 ± 5 °C at -20 ± 5 °C	при -75 ± 10 °C at -75 ± 10 °C
Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Анализируются свежеприготовленными; хранение при 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	Анализируются при хранении в автосамплере хроматографа не менее 31 часа при 5 ± 3 °C Analyzed stored in a chromatograph autosampler for at least 31 hours at 5 ± 3 °C	Анализируются после 5 циклов заморозки – разморозки: не менее 60 часов при -42,5 ± 7,5 °C (заморозка) и не менее 10 часов при 20 ± 5 °C (разморозка) Analyzed after 5 freeze-thaw cycles: at least 60 hours at -42,5 ± 7,5 °C (freeze) and at least 10 hours at 20 ± 5 °C (thaw)	Анализируются после хранения в течение 67 дней при -42,5 ± 7,5 °C Analyzed after storage for 67 days at -42,5 ± 7,5 °C			Анализируются на уровнях L и H при хранении в течение 67 дней Analyzed at levels L and H when stored for 67 days		Анализируются на уровнях L и H при хранении в течение 95 дней Analyzed at levels L and H when stored for 95 days
Среднее Average	L	2,74	3,22	3,41	3,40	3,40	3,41	3,07	2,70
	H	233,39	222,17	262,63	271,64	269,61	269,55	230,17	249,81
E, %	L	-8,60	7,47	13,80	13,47	13,20	13,60	2,20	-9,87
	H	-2,75	-7,43	9,43	13,19	12,34	12,31	-4,10	4,09

Таблица 10. Оценка переноса пробы
Table 10. Assessment of carry-over effect

№	Образец Sample	Значение площади Area value		Отношение площадей, % Area ratio, %	
		Апиксабан Apixaban	Ривароксабан Rivaroxaban	Апиксабан Apixaban	Ривароксабан Rivaroxaban
1	НПКО LLOQ	2733	285441	–	–
	Интактная плазма крови Blank blood plasma	0	270	0,00	0,09
2	НПКО LLOQ	2356	252589	–	–
	Интактная плазма крови Blank blood plasma	0	0	0,00	0,00
3	НПКО LLOQ	2431	276251	–	–
	Интактная плазма крови Blank blood plasma	0	0	0,00	0,00

Таблица 11. Оценка точности и прецизионности при разбавлении образцов
Table 11. Inter-day accuracy and precision of sample dilution

Образец Sample	Введено (нг/мл) Injected (ng/mL)	Разведение Dilution	Среднее Average	SD, %	RSD, %	E, %
L	3,00	1:1	2,85	0,33	0,11	–5,19
H	240,00	1:1	212,93	2,59	0,01	–12,72

После приема исследуемого препарата и препарата сравнения были зарегистрированы индивидуальные профили изменения значений концентраций апиксабана в плазме крови человека во времени. Данные профили 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 ($AUC_{(0-t)}$), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$).

Значения фармакокинетических параметров, включающие среднее арифметическое (Mean) и среднее геометрическое значения (Geom Mean), а также значения стандартных отклонений (SD) и коэффициентов вариации (CV, %) приведены в таблице 12. Усредненные фармакокинетические профили во времени исследуемого препарата (Test) и препарата сравнения (Ref.) приведены на рисунках 8 и 9. Данные профили представлены в линейном и лог-линейном преобразовании: на рисунке 8 без стандартных отклонений, на рисунке 9 со стандартными отклонениями.

Таблица 12. Значения фармакокинетических параметров апиксабана
Table 12. Values of pharmacokinetic parameters of apixaban

Фармакокинетические параметры Pharmacokinetic parameters	Исследуемый препарат Test drug				Препарат сравнения Reference drug			
	Mean	Geom Mean	SD	CV, %	Mean	Geom Mean	SD	CV, %
$AUC_{(0-t)}$ нг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$ ng · h/mL	2190,19	2097,50	592,65	27,06	2065,97	1976,97	563,69	27,28
$AUC_{(0-\infty)}$ нг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$ ng · h/mL	2220,23	2129,65	589,84	26,57	2107,05	2021,57	561,91	26,67
C_{max} нг/мл C_{max} ng/mL	265,35	254,48	71,82	27,07	235,82	226,40	63,40	26,89

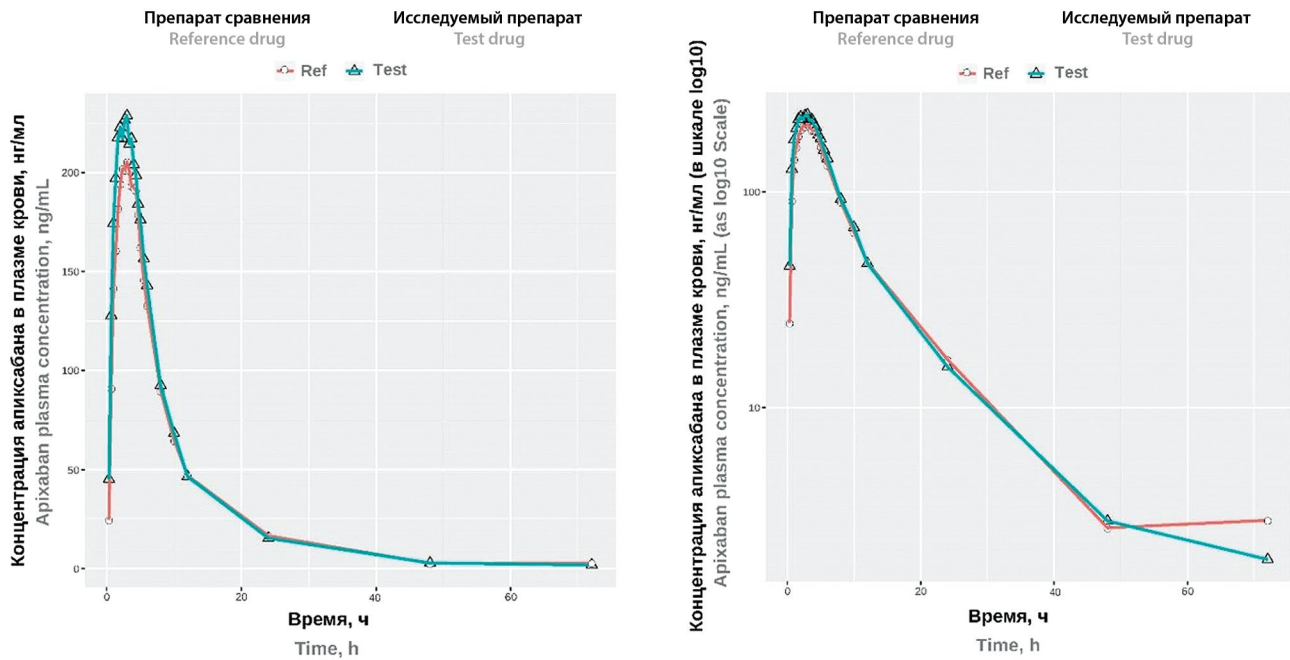


Рисунок 8. Усредненные фармакокинетические профили апиксабана (в линейных и в логлинейных координатах)

Figure 8. Average pharmacokinetic profiles of apixaban (in linear and log-linear scale)

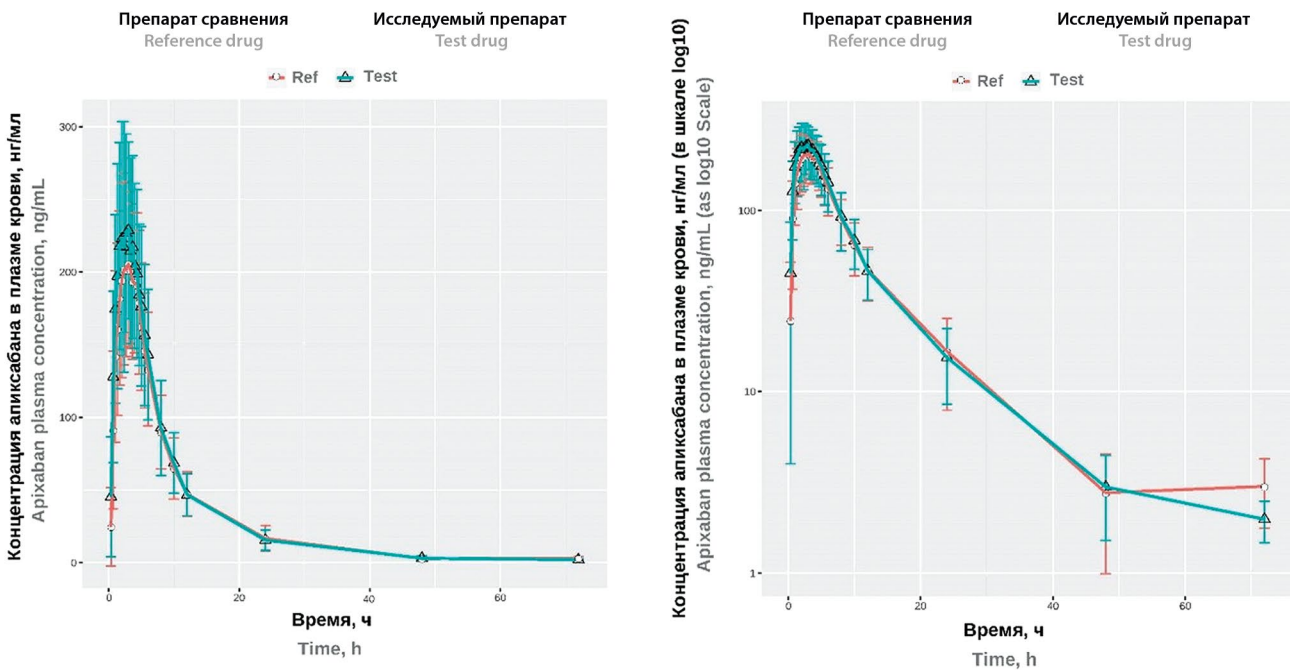


Рисунок 9. Усредненные фармакокинетические профили апиксабана (в линейных и в логлинейных координатах со стандартными отклонениями)

Figure 9. Average pharmacokinetic profiles of apixaban (in linear and log-linear scale with standard deviations)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована чувствительная методика количественного определения апиксабана в плазме крови человека с помощью метода

ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном 1,00–300,00 нг/мл. Данная методика отличается быстрым и простым способом пробоподготовки, коротким временем анализа, что значительно ускоряет проведение исследования, а также исполь-

зованием легкодоступного вещества в качестве внутреннего стандарта. Данная методика успешно прошла апробацию при проведении аналитической части исследования биоэквивалентности препарата апиксабана и может применяться для других фармакокинетических исследований препаратов апиксабана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Н. М., Ткачева О. Н. Антикоагулянтная терапия у пожилых пациентов: дилемма выбора между эффективностью и безопасностью. *Медицинский алфавит*. 2018;2(16):6–14.
2. Панченко Е. П. Антитромботическая терапия ишемической болезни сердца: основы, проверенные временем. *Терапевтический архив*. 2019;91(6):19–24. DOI: 10.26442/00403660.2019.06.000296.
3. Бокарев И. Н., Кондратьева Т. Б. Новые оральные антикоагулянты в клинической практике. Эффективность и проблемы. *Клиническая медицина*. 2016;94(5):383–387. DOI: 10.18821/0023-2149-5-383-387.
4. Van Rein N., Heide-Jørgensen U., Lijfering W. M., Dekkers O. M., Sørensen H. T., Cannegieter S. C. Major bleeding rates in atrial fibrillation patients on single, dual, or triple antithrombotic therapy: results from a Nationwide Danish Cohort Study. *Circulation*. 2019;139(6):775–786. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036248.
5. Cools F., Wollaert B., Vervoort G., Verstraete S., Voet J., Hermans K., Heyse A., De Wolf A., Hollanders G., Boussy T., Anné W., Vercammen J., Faes D., Beutels M., Mairesse G., Purnode Ph., Blankoff I., Vandergoten P., Capiou L., Allu J., Bassand J., Kayani G. Treatment patterns in anticoagulant therapy in patients with newly diagnosed atrial fibrillation in Belgium: results from the GARFIELD-AF registry. *Acta Cardiologica*. 2018;74(4):309–318. DOI: 10.1080/00015385.2018.1494089.
6. Мелехов А. В., Гендлин Г. Е., Дадашова Э. Ф., Алексеева Е. М., Заиграев И. А., Никитин И. Г. Динамика применения антитромботических препаратов у больных с фибрилляцией предсердий: собственные данные и обзор отечественных регистров. *Российский медицинский журнал*. 2017;23(3):116–126. DOI: 10.18821/0869-2106-2017-23-3-116-126.
7. Груздева А. А., Хохлов А. Л., Ильин М. В. Оральные антикоагулянты в профилактике тромбозомболических осложнений у кардиологических пациентов: анализ применения в Российской Федерации. *Качественная клиническая практика*. 2020;1:69–79. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-1-69-79.
8. Колбин А. С., Касимова А. Р., Гиляревский С. Р. Сравнительный фармакоэкономический анализ применения апиксабана, ривароксабана и дабигатрана для профилактики развития инсульта и эмболий в сосуды большого круга кровообращения у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. *Качественная клиническая практика*. 2022;4:50–59. DOI: 10.37489/2588-0519-2022-4-50-59.
9. Dzudovic J., Sakac M. C., Antunovic M., Repic A., Obradovic S., Djordjevic S., Dzudovic B. Development and validation of LC-MS/MS method for determination of plasma apixaban. *Acta Chromatographica*. 2022;34(3):332–337. DOI: 10.1556/1326.2021.00948.
10. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J. H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020;7:e438–e440. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
11. Wenzler E., Engineer M. H., Yaqoob M., Benken S. T. Safety and efficacy of apixaban for therapeutic anticoagulation in critically ill ICU patients with severe COVID-19 respiratory disease. *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4(04):e376–e382. DOI: 10.1055/s-0040-1720962.
12. Billett H. H., Reyes-Gil M., Szymanski J., Ikemura K., Stahl L. R., Lo Y., Rahman S., Gonzalez-Lugo J. D., Kushnir M., Barouqa M., Golestaneh L., Bellin E. Anticoagulation in COVID-19: effect of enoxaparin, heparin, and apixaban on mortality. *Thrombosis and haemostasis*. 2020;120(12):1691–1699. DOI: 10.1055/s-0040-1720978.
13. Appiah D., Quinn N. J., Messing E. G., Veltri K. T. Safety and efficacy analysis of apixaban compared to heparins in hospitalized non-critically ill COVID-19 patients. *Hospital Pharmacy*. 2022;57(6):727–733. DOI: 10.1177/00185787221095764.
14. Pinto D. J., Orwat M. J., Koch S., Rossi K. A., Alexander R. S., Smallwood A., Wong P. C., Rendina A. R., Luetting J. M., Knabb R. M., He K., Xin B., Wexler R. R., Lam P. Y. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(22):5339–5356. DOI: 10.1021/jm070245n.
15. Luetting J. M., Knabb R. M., He K., Pinto D. J., Rendina A. R. Apixaban inhibition of factor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein systems and in human plasma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011;26(4):514–526. DOI: 10.3109/14756366.2010.535793.
16. Byon W., Garonzik S., Boyd R. A., Frost C. E. Apixaban: a clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clinical pharmacokinetics*. 2019;58(10):1265–1279. DOI: 10.1007/s40262-019-00775-z.
17. Granger C. B., Alexander J. H., McMurray J. J. V., Lopes R. D., Hylek E. M., Hanna M., Al-Khalidi H. R., Ansell J., Atar D., Avezum A., Bahit M. C., Diaz R., Easton J. D., Ezekowitz J. A., Flaker G., Garcia D., Gerdas M., Gersh B. J., Golitsyn S., Goto S., Hermosillo A. G., Hohnloser S. H., Horowitz J., Mohan P., Jansky P., Lewis B. S., Lopez-Sendon J. L., Pais P., Parkhomenko A., Verheugt F. W. A., Zhu J., Wallentin L. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(11):981–992. DOI: 10.1056/NEJMoa1107039.
18. Романова М. В., Пузенко Д. В. Некоторые аспекты применения антикоагулянтов при венозных тромбозах, тромбозах легочной артерии. Фокус на пожилых пациентах. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(3):97–106. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4944.
19. Hylek E. M., Held C., Alexander J. H., Lopes R. D., De Caterina R., Wojdyla D. M., Huber K., Jansky P., Steg P. H., Hanna M., Thomas L., Wallentin L., Granger C. B. Major bleeding in patients with atrial fibrillation receiving apixaban or warfarin: The ARISTOTLE Trial (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation): Predictors, Characteristics, and Clinical Outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(20):2141–2147. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.549.
20. Avezum A., Lopes R. D., Schulte P. J., Lanis F., Gersh B. J., Hanna M., Pais P., Erol C., Diaz R., Bahit M. C., Bartunek J., De Caterina R., Goto S., Ruzyllo W., Zhu J., Granger C. B., Alexander J. H. Apixaban in comparison with warfarin in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease: findings from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial. *Circulation*. 2015;132(8):624–632. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014807.
21. Lip G. Y., Keshishian A., Li X., Hamilton M., Masseria C., Gupta K., Luo X., Mardekian J., Friend K., Nadkarni A., Pan X., Baser O., Deitelzweig S. Effectiveness and safety of oral anti-coagulants among nonvalvular atrial fibrillation patients: the ARISTOPHANES study. *Stroke*. 2018;49(12):2933–2944. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.020232.
22. Fralick M., Colacci M., Schneeweiss S., Huybrechts K. F., Lin K. J., Gagne J. J. Effectiveness and safety of apixaban compared with rivaroxaban for patients with atrial fibrillation in routine practice: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2020;172(7):463–473. DOI: 10.7326/M19-2522.
23. Rutherford O. C. W., Jonasson C., Ghanima W., Söderdahl F., Halvorsen S. Comparison of dabigatran, rivaroxaban, and apixaban for effectiveness and safety in atrial fibrillation: a nationwide

- cohort study. *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2020;6(2):75–85. DOI: 10.1093/ehjcvp/pvz086.
24. Jeong H.-C., Kim T.-E., Shin K.-H. Quantification of apixaban in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Translational and Clinical Pharmacology*. 2019;27(1):33–41. DOI: 10.12793/tcp.2019.27.1.33.
25. Rodina T. A., Melnikov E. S., Aksenov A. A., Belkov S. A., Sokolov A. V., Prokof'ev A. B., Ramenskaya G. V. Simultaneous Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, and Warfarin in Human Blood Serum by HPLC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(2):289–293. DOI: 10.1007/s11094-022-02633-y.
26. Gouveia F., Bicker J., Santos J., Rocha M., Alves G., Falcão A., Fortuna A. Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;181:113109. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113109.
27. Cini M., Legnani C., Padriani R., Cosmi B., Dellanoce C., De Rosa G., Palareti G., Marcucci R., Pengo V., Poli D., Testa S. DOAC plasma levels measured by chromogenic anti-Xa assays and HPLC-UV in apixaban- and rivaroxaban-treated patients from the START-Register. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020;42(2):214–222. DOI: 10.1111/ijlh.13159.
28. Lindahl S., Dyrkorn R., Spigset O., Hegstad S. Quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human serum by UHPLC-MS/MS – method development, validation, and application. *Therapeutic drug monitoring*. 2018;40(3):369. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000509.
29. Raghavan N., Frost C. E., Yu Z., He K., Zhang H., Humphreys W. G., Zhang D., Pinto D., Chen S., Bonacorsi S., Wong P. C. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug metabolism and disposition*. 2009;37(1):74–81. DOI: 10.1124/dmd.108.023143.
- tients: analysis of use in the Russian Federation. *Good Clinical Practice*. 2020;1:69–79. (In Russ) DOI: 10.37489/2588-0519-2020-1-69-79.
8. Kolbin A. S., Kasimova A. R., Gilyarevskiy S. R. Comparative pharmacoeconomic analysis of the use of apixaban, rivaroxaban and dabigatran for prevention of stroke and embolism in the vessels of the systemic circulation in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Good Clinical Practice*. 2022;(4):50–59. (In Russ). DOI: 10.37489/2588-0519-2022-4-50-59.
9. Dzudovic J., Sakac M. C., Antunovic M., Repic A., Obradovic S., Djordjevic S., Dzudovic B. Development and validation of LC-MS/MS method for determination of plasma apixaban. *Acta Chromatographica*. 2022;34(3):332–337. DOI: 10.1556/1326.2021.00948.
10. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J. H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020;7:e438–e440. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
11. Wenzler E., Engineer M. H., Yaqoob M., Benken S. T. Safety and efficacy of apixaban for therapeutic anticoagulation in critically ill ICU patients with severe COVID-19 respiratory disease. *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4(04):e376–e382. DOI: 10.1055/s-0040-1720962.
12. Billett H. H., Reyes-Gil M., Szymanski J., Ikemura K., Stahl L. R., Lo Y., Rahman S., Gonzalez-Lugo J. D., Kushnir M., Barouqa M., Goleshtaneh L., Bellin E. Anticoagulation in COVID-19: effect of enoxaparin, heparin, and apixaban on mortality. *Thrombosis and haemostasis*. 2020;120(12):1691–1699. DOI: 10.1055/s-0040-1720978.
13. Appiah D., Quinn N. J., Messing E. G., Veltri K. T. Safety and efficacy analysis of apixaban compared to heparins in hospitalized non-critically ill COVID-19 patients. *Hospital Pharmacy*. 2022;57(6):727–733. DOI: 10.1177/00185787221095764.
14. Pinto D. J., Orwat M. J., Koch S., Rossi K. A., Alexander R. S., Smallwood A., Wong P. C., Rendina A. R., Luetzgen J. M., Knabb R. M., He K., Xin B., Wexler R. R., Lam P. Y. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(22):5339–5356. DOI: 10.1021/jm070245n.
15. Luetzgen J. M., Knabb R. M., He K., Pinto D. J., Rendina A. R. Apixaban inhibition of factor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein systems and in human plasma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011;26(4):514–526. DOI: 10.3109/14756366.2010.535793.
16. Byon W., Garonzik S., Boyd R. A., Frost C. E. Apixaban: a clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clinical pharmacokinetics*. 2019;58(10):1265–1279. DOI: 10.1007/s40262-019-00775-z.
17. Granger C. B., Alexander J. H., McMurray J. J. V., Lopes R. D., Hylek E. M., Hanna M., Al-Khalidi H. R., Ansell J., Atar D., Avezum A., Bahit M. C., Diaz R., Easton J. D., Ezekowitz J. A., Flaker G., Garcia D., Gerdas M., Gersh B. J., Golitsyn S., Goto S., Hermosillo A. G., Hohnloser S. H., Horowitz J., Mohan P., Jansky P., Lewis B. S., Lopez-Sendon J. L., Pais P., Parkhomenko A., Verheugt F. W. A., Zhu J., Wallentin L. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(11):981–992. DOI: 10.1056/NEJMoa1107039.
18. Romanova M. V., Puzenko D. V. Aspects of anticoagulant therapy in venous thromboembolism, pulmonary embolism. Focus on elderly patients. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(3):97–106. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4944.
19. Hylek E. M., Held C., Alexander J. H., Lopes R. D., De Caterina R., Wojdyla D. M., Huber K., Jansky P., Steg P. G., Hanna M., Thomas L., Wallentin L., Granger C. B. Major bleeding in patients with atrial fibrillation receiving apixaban or warfarin: The ARISTOTLE Trial (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation): Predictors, Characteristics, and Clinical Outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(20):2141–2147. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.549.

REFERENCES

1. Vorobyeva N. M., Tkachyova O. N. Anticoagulant therapy in elderly patients: dilemma of choice between efficacy and safety. *Medical alphabet*. 2018;2(16):6–14. (In Russ.)
2. Panchenko E. P. Antithrombotic therapy of coronary heart disease: time-tested essential principles. *Therapeutic Archive*. 2019;91(6):19–24. (In Russ.) DOI: 10.26442/00403660.2019.06.000296.
3. Bokarev I. N., Kondrat'eva T. B. New anticoagulants in clinical practice. Effectiveness and problems. *Clinical Medicine*. 2016;94(5):383–387. (In Russ.) DOI: 10.18821/0023-2149-2016-94-5-383-387.
4. Van Rein N., Heide-Jørgensen U., Lijfering W. M., Dekkers O. M., Sørensen H. T., Cannegieter S. C. Major bleeding rates in atrial fibrillation patients on single, dual, or triple antithrombotic therapy: results from a Nationwide Danish Cohort Study. *Circulation*. 2019;139(6):775–786. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036248.
5. Cools F., Wollaert B., Vervoort G., Verstraete S., Voet J., Hermans K., Heyse A., De Wolf A., Hollanders G., Boussy T., Anné W., Vercammen J., Faes D., Beutels M., Mairesse G., Purnode Ph., Blankoff I., Vandergoten P., Capiu L., Allu J., Bassand J., Kayani G. Treatment patterns in anticoagulant therapy in patients with newly diagnosed atrial fibrillation in Belgium: results from the GARFIELD-AF registry. *Acta Cardiologica*. 2018;74(4):309–318. DOI: 10.1080/00015385.2018.1494089.
6. Melekhov A. V., Gendlin G. E., Dadashova E. F., Alekseeva E. M., Zaigraev I. A., Nikitin I. G. The dynamics of application of anti-thrombotic in patients fibrillation of atriums: original data and review of national registers. *Medical Journal of the Russian Federation*. 2017;23(3):116–126. (In Russ.) DOI: 10.18821/0869-2106-2017-23-3-116-126.
7. Gruzdeva A. A., Khokhlov A. L., Ilyin M. V. Oral anticoagulants in the prevention of thromboembolic complications in cardiac pa-

20. Avezum A., Lopes R. D., Schulte P. J., Lanas F., Gersh B. J., Hanna M., Pais P., Erol C., Diaz R., Bahit M. C., Bartunek J., De Caterina R., Goto S., Ruzyllo W., Zhu J., Granger C. B., Alexander J. H. Apixaban in comparison with warfarin in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease: findings from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial. *Circulation*. 2015;132(8):624–632. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014807.
21. Lip G. Y., Keshishian A., Li X., Hamilton M., Masseria C., Gupta K., Luo X., Mardekian J., Friend K., Nadkarni A., Pan X., Bassler O., Deitelzweig S. Effectiveness and safety of oral anticoagulants among nonvalvular atrial fibrillation patients: the ARISTOPHANES study. *Stroke*. 2018;49(12):2933–2944. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.020232.
22. Fralick M., Colacci M., Schneeweiss S., Huybrechts K. F., Lin K. J., Gagne J. J. Effectiveness and safety of apixaban compared with rivaroxaban for patients with atrial fibrillation in routine practice: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2020;172(7):463–473. DOI: 10.7326/M19-2522.
23. Rutherford O. C. W., Jonasson C., Ghanima W., Söderdahl F., Halvorsen S. Comparison of dabigatran, rivaroxaban, and apixaban for effectiveness and safety in atrial fibrillation: a nationwide cohort study. *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2020;6(2):75–85. DOI: 10.1093/ehjcvp/pvz086.
24. Jeong H.-C., Kim T.-E., Shin K.-H. Quantification of apixaban in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Translational and Clinical Pharmacology*. 2019;27(1):33–41. DOI: 10.12793/tcp.2019.27.1.33.
25. Rodina T. A., Melnikov E. S., Aksenov A. A., Belkov S. A., Sokolov A. V., Prokof'ev A. B., Ramenskaya G. V. Simultaneous Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, and Warfarin in Human Blood Serum by HPLC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(2):289–293. DOI: 10.1007/s11094-022-02633-y.
26. Gouveia F., Bicker J., Santos J., Rocha M., Alves G., Falcão A., Fortuna A. Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;181:113109. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113109.
27. Cini M., Legnani C., Padriani R., Cosmi B., Dellanoce C., De Rosa G., Palareti G., Marcucci R., Pengo V., Poli D., Testa S. DOAC plasma levels measured by chromogenic anti-Xa assays and HPLC-UV in apixaban- and rivaroxaban-treated patients from the START-Register. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020;42(2):214–222. DOI: 10.1111/ijlh.13159.
28. Lindahl S., Dyrkorn R., Spigset O., Hegstad S. Quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human serum by UHPLC-MS/MS – method development, validation, and application. *Therapeutic drug monitoring*. 2018;40(3):369. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000509.
29. Raghavan N., Frost C. E., Yu Z., He K., Zhang H., Humphreys W. G., Zhang D., Pinto D., Chen S., Bonacorsi S., Wong P. C. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug metabolism and disposition*. 2009;37(1):74–81. DOI: 10.1124/dmd.108.023143.