https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС

Т. Н. Комаров[1]*, И. Е. Шохин[1,2], О. А. Мискив[1], Д. С. Богданова[1], А. В. Алешина[1], Ю. В. Медведев[1,3], Н. С. Багаева[1]

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
3 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

***Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 15.01.2020. **Статья принята к печати:** 21.02.2020

Резюме

Введение. ВИЧ-инфекция является одним из наиболее актуальных заболеваний современности с медицинской, эпидемиологической и социальной точки зрения. Своевременная диагностика, выявление и контроль заболевания, адекватное назначение антиретровирусной терапии позволяют в достаточной степени снизить вирусную нагрузку на организм пациента, снизить риски передачи инфекции. В настоящее время в качестве терапии всё чаще назначаются комбинации различных антиретровирусных лекарственных средств. Одной из перспективных комбинаций является совместное применение атазанавира и ритонавира. Важнейшим этапом для изучения фармакокинетического взаимодействия, исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности является разработка аналитической методики, позволяющей определять исследуемые вещества в плазме крови человека. В настоящее время нет опубликованных методик о совместном определении атазанавира и ритонавира в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием с применением одноквадрупольного масс-детектора. В данной работе приведена разработка и валидация методики совместного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови после пробоподготовки способом осаждения белков.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,0–10000,0 нг/мл для атазанавира и 10,0–2500,0 нг/мл для ритонавира. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих атазанавир и ритонавир.

Ключевые слова: атазанавир, ритонавир, плазма, ВЭЖХ-МС, определение, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

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

Для цитирования: Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 99–108.

Development and Validation of Atazanavir and Ritonavir Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method

Timofey N. Komarov[1]*, Igor E. Shohin[1,2], Olga A. Miskiv[1], Dana S. Bogdanova[1], Alexandra V. Aleshina[1], Yuri V. Medvedev[1,3], Natalia S. Bagaeva[1]

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
2 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
3 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

***Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.n.komarov@yandex.ru

Received: 15.01.2020. **Accepted:** 21.02.2020

Abstract

Introduction. HIV infection is one of the most relevant diseases from a medical, epidemiological and social point of view. Timely diagnosis, detection and control of the disease, adequate prescription of antiretroviral therapy can sufficiently reduce the viral load on the patient's body, reduce the risk of transmission of infection. Currently, combinations of various antiretroviral drugs are increasingly being prescribed as therapy. One of the most important is combination of atazanavir and ritonavir. The most important stage for the study of pharmacokinetics, studies of comparative pharmacokinetics and bioequivalence is the development of an analytical method that allows you to determine the investigated substances in human plasma. There are currently no published methods for the determination of atazanavir and ritonavir in human plasma using high performance liquid

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., 2020
© Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S., 2020

chromatography with mass selective detection using a single quadrupole mass detector. In this article presents the development and validation of a method for the determination of atazanavir and ritonavir in blood plasma after sample preparation by the method of protein precipitation.
Aim. The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of atazanavir and ritonavir in human plasma by HPLC with mass spectrometric detection for performing the analytical part of pharmacokinetic studies.
Materials and methods. Determination of atazanavir and ritonavir in human plasma by HPLC with mass spectrometric detection. A sample was prepared using protein deposition.
Results and discussion. The method was validated of selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, limit of quantification, carry-over effect and sample stability.
Conclusion. The method of the determination of atazanavir and ritonavir in human plasma was developed and validated by HPLC-MS. The analytical range of the was 50.0–10000.0 ng/mL in plasma for atazanavir and 10.0–2500.0 ng/mL in plasma for ritonavir. Method could be applied to determination of atazanavir and ritonavir in plasma for PK and BE studies.

Keywords: atazanavir, ritonavir, plasma, HPLC-MS, determination, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

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

For citation: Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and validation of atazanavir and ritonavir determination in human plasma by HPLC-MS method. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 99–108.

ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ-инфекция остаётся одним из наиболее распространённых инфекционных заболеваний современности и наиболее важной и сложной проблемой здравоохранения в силу своей социальной, медицинской и демографической значимости [1]. В связи с тем, что распространение ВИЧ в мире растёт с каждым годом, основной путь в борьбе с этим заболеванием должен быть направлен на профилактические мероприятия [2]. Вместе с тем своевременное назначение антиретровирусной терапии (АРВТ) у лиц с подтверждённым ВИЧ-положительным снижает частоту развития оппортунистических инфекций и смертность среди ВИЧ-инфицированных [3, 4].

Атазанавир – антиретровирусный препарат, активный против ВИЧ-1, относящийся к группе ингибиторов протеазы (ИП) ВИЧ. Протеаза ВИЧ представляет собой фермент, осуществляющий протеолитическое расщепление полипротеиновых предшественников вируса на отдельные белки, входящие в состав ВИЧ. Подавление этого фермента нарушает образование белков вирусного капсида и созревание вируса, что приводит к формированию незрелых вирусных частиц, неспособных инфицировать другие клетки. По антиретровирусной активности *in vitro* атазанавир превосходит другие ИП – ампренавир, индинавир, нелфинавир, ритонавир и саквинавир. Отличительными фармакокинетическими особенностями атазанавира являются высокая биодоступность и возможность однократного приема в сутки. Равновесная концентрация препарата достигается примерно через 6 дней лечения. При приеме атазанавира совместно с низкими дозами (100 мг в сутки) ритонавира (так называемый «усиленный», или бустированный режим) отмечается повышение концентрации атазанавира в плазме крови [5].

Атазанавир является слабым ингибитором CYP3A [6]. Было обнаружено, что атазанавир подвергается пяти различным «биотрансформационным» фазам через микросомальные инкубации печени человека (рисунок 1). Эти пять путей продуцировали 16 метаболитов, включая:

1) моноокисление (M1-M4);
2) окислительное декарбоксилирование (M5-M6);
3) окислительную дегидратацию (M7-M8);
4) моноокисление и окислительное декарбоксилирование (M9-M12);
5) окисление (M13-M16).

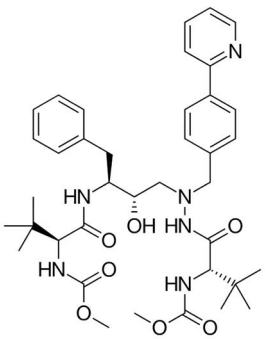

Рисунок 1. Структурная формула атазанавира

Figure 1. The structural formula of atazanavir

Было идентифицировано шесть преобладающих метаболитов, наиболее распространенными являются метаболиты моноокисления M2 и M1 [6].

Наблюдались заметные различия между CYP3A4 и CYP3A5. Наиболее важно, что CYP3A5 продуцировал основные метаболиты моноокисления M1 и M2 со зна-

чительно более быстрыми темпами, чем CYP3A4: в 32 раза быстрее для M1 и в 2,6 раза быстрее для M2 [7]. Поскольку атазанавир метаболизируется в печени при участии изофермента CYP3A4, при одновременном применении с другими препаратами, метаболизирующимися данным изоферментом (в том числе блокаторами кальциевых каналов, ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы и ингибиторами ФДЭ-5, включая силденафил, тадалафил, варденафил) возможно повышение концентрации в плазме крови одного из компонентов. Это может привести к усилению и пролонгированию терапевтического и побочного действия ингибитора ФДЭ 5 [8].

Ритонавир представляет собой ингибитор аспартил-протеаз ВИЧ-1 и ВИЧ-2 для приема внутрь, активный пептидомиметик. Ритонавир ингибирует протеазу ВИЧ, которая расщепляет структурные и репликативные белки, возникающие из основных генов ВИЧ, таких как gag и pol. Gag кодирует белки, участвующие в ядре и нуклеокапсиде, тогда как pol кодирует обратную транскриптазу ВИЧ, рибонуклеазу H, интегразу и протеазу. Pol-кодированные белки первоначально переводятся в виде более крупного прекурсового полипептида, gag-pol, и его необходимо расщепить протеазой ВИЧ с образованием других комплементных белков. Ритонавир предотвращает расщепление полипротеина gag-pol, что приводит к неинфекционным, незрелым вирусным частицам [9].

Исследования *in vitro* также продемонстрировали, что атазанавир является одновременно ингибитором и индуктором PP-гликопротеинового АТФ-зависимого оттока, который обладает широким клеточным распределением и широкой субстратной специфичностью, что еще больше увеличивает его потенциал для взаимодействия лекарственных средств и переменных фармакокинетик *in vivo* [10]. Поэтому Атазанавир следует использовать с осторожностью у пациентов, принимающих сильные ингибиторы CYP3A4, умеренные или сильные индукторы CYP3A4 и основные субстраты CYP3A4. При одновременном применении атазанавира с ингибиторами изофермента CYP3A4 возможно повышение концентрации атазанавира в плазме крови [8].

Применение атазанавира у здоровых добровольцев в дозе 300 мг совместно с ритонавиром ведет к увеличению C_{max} в 1,86, а AUC – в 3,38 раза по сравнению с данными параметрами при назначении 400 мг одного АТВ. Это клинически значимое лекарственное взаимодействие обусловлено ингибированием ритонавиром CYP3A, в результате чего замедляется метаболизм АТВ. Именно этим обусловлена перспективность создания и терапевтического применения комбинированной лекарственной формы атазанавира и ритонавира. Неотъемлемой частью разработки комбинированного лекарственного средства является изучение его фармакокинетики.

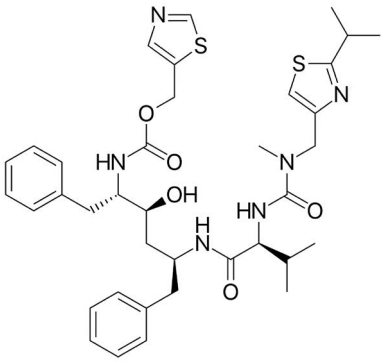

Рисунок 2. **Структурная формула ритонавира**

Figure 2. **The structural formula of ritonavir**

Для количественного определения атазанавира и комбинированного препарата атазанавира с ритонавиром в биологических объектах при проведении клинических и доклинических исследований на сегодняшний момент, исходя из их физико-химических свойств, использовались такие методики определения, как высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) в сочетании с пробоподготовкой твердофазной экстракции (ТФЭ) [11, 12], и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектором (ВЭЖХ-МС/МС) в сочетании с пробоподготовкой твердофазной и жидкостной экстракции (ЖЖЭ) [13–15]. Данные методик приведены в таблице 1.

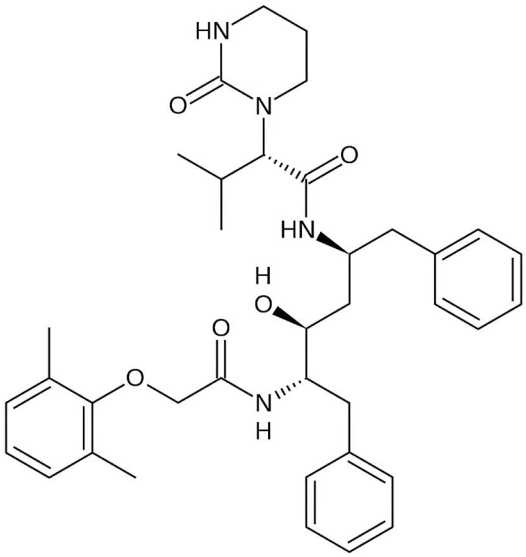

Рисунок 3. **Структурная формула ритонавира**

Figure 3. **The structural formula of ritonavir**

Как показал анализ литературы в настоящее время нет опубликованных данных по совместному определению атазанавира и ритонавира в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС с одноквадрупольным

детектированием с целью применения для исследования фармакокинетики атазанавира и ритонавира, применяемых в составе комбинированных лекарственных форм.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения атазанавира и ритонавира

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of atazanavir and ritonavir

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
Атазанавир			
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	156,0–1000,0	[11]
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	20,0–10000,0	[12]
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	10,0–4000,0	[13]
Ритонавир			
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	2,0–2280,0	[14]
Атазанавир и ритонавир			
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	5,0–500,0 и 1,0–500,0 соотв.	[15]

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при помощи одноквадрупольного масс-детектора (ВЭЖХ-МС). В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II с масс-селективным детектором 6125, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и тандемным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (LC-MS grade, Biosolve, Израиль); муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore); вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы субстанции атазанавира сульфат (содержание 99,9 %, Sigma Aldrich), ритонавир (содержание 99,9 %, Sigma Aldrich), прометазина гидрохлорид (содержание 99,9 %, Sigma Aldrich).

Исходные стандартные растворы атазанавира, ритонавира и прометазина (внутренний стандарт) готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, промежуточные и рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходные стандартные растворы, промежуточные и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 300 мкл калибровочного образца (либо к 300 мкл интактной плазмы крови для приготовления бланка, либо к 300 мкл образца плазмы крови добровольца), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляют 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта прометазина (5000,00 нг/мл), затем прибавляют 900 мкл ацетонитрила, перемешивают на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугируют в течение 15 мин со скоростью 13 500 об/мин. Далее 1000 мкл супернатанта переносят в хроматографические виалы и помещают в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

Уровень	Концентрация аналита, нг/мл		Концентрация внутреннего стандарта, мл
	Атазанавир	Ритонавир	Прометазин
1	50,0	10,0	500,0
2	100,0	25,0	500,0
3	250,0	50,0	500,0
4	500,0	100,0	500,0
5	1000,0	250,0	500,0
6	2500,0	500,0	500,0
7	5000,0	1000,0	500,0
8	10000,0	2500,0	500,0

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna C18, 50 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму); элюент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	83	17	1,00
0,50	83	17	
2,90	35	65	
3,80	0	100	
5,00	0	100	
5,10	83	17	
6,50	83	17	

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–6,5 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 250 кПа, осушающий газ 13 л/мин, температура источника ионизации 350 °С, напряжение на капилляре +3 кВ.
- Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме SIM (Single Ion Monitoring). Условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Условия масс-спектрометрического детектирования исследуемых веществ

Table 4. The conditions of mass-spectrometric detection of the investigated substances

Исследуемое вещество	Исследуемый ион (m/z)	Режим ионизации
Атазанавир	705,8	+
Ритонавир	721,6	+
Прометазин	285,2	+

- Время удерживания атазанавира: около 3,10 мин.
- Время удерживания ритонавира: около 3,75 мин.
- Время удерживания прометазина: около 2,28 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств том I [9], а также руководств FDA [10] и EMA [11] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность образцов (стабильность исходного и рабочих растворов аналита; стабильность замороженного и размороженного аналита, перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру; краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре; долгосрочная стабильность аналита в матрице при низкотемпературной заморозке).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников и образцов интактной плазмы крови с прибавлением смешанных рабочих стандартных растворов атазанавира и ритонавира, а также раствора внутреннего стандарта до концентраций, указанных в таблице 2. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующими временам удерживания атазанавира, ритонавира и прометазина. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 4 и 5.

Эффект матрицы

Было оценено влияние биологической матрицы на количественное определение атазанавира в комбинации с ритонавиром в плазме крови человека. Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов атазанавира, ритонавира и раствора внутреннего стандарта прометазина без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме крови без учёта влияния степени извлечения атазанавира, ритонавира и прометазина. Эффект матрицы был оценен на низком и верхнем уровнях аналитического диапазона концентраций атазанавира (100,0 нг/мл и 10000,0 нг/мл) и ритонавира (25,0 нг/мл и 2500 нг/мл). Данные представлены в таблице 5. Для внутреннего стандарта (прометазин) эффект матрицы был рассчитан на уровне 500,0 нг/мл.

Фактор матрицы рассчитывался как отношение значения площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного на плазме после осаждения белков (учитывает влияние биологической матрицы, но не учитывает степень извлечения) к значению площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали как отношение значения фактора матрицы атазанавира к фактору матрицы прометазина (внутренний стандарт). Коэффициент вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, не должен превышать 15 %.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора внутреннего стандарта и смешанных рабочих стандартных растворов до получения концентраций анализируемых веществ и внутреннего стандарта, указанных в таблице 2, соответствующих каждому калибровочному уровню. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта от отношения концентрации аналита к концентрации внутреннего стандарта в плазме крови. Графики приведены на рисунках 6 и 7.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 6.

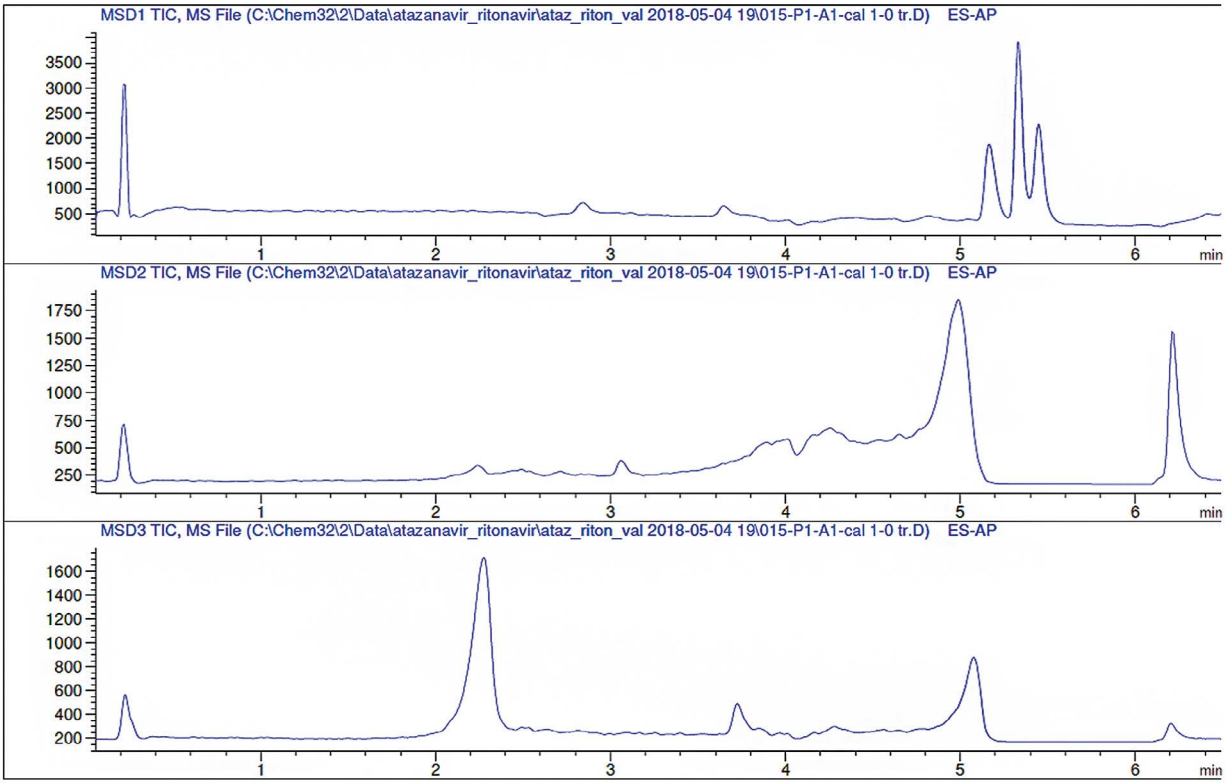

Рисунок 4. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 4. **Chromatogram of a blank plasma sample**

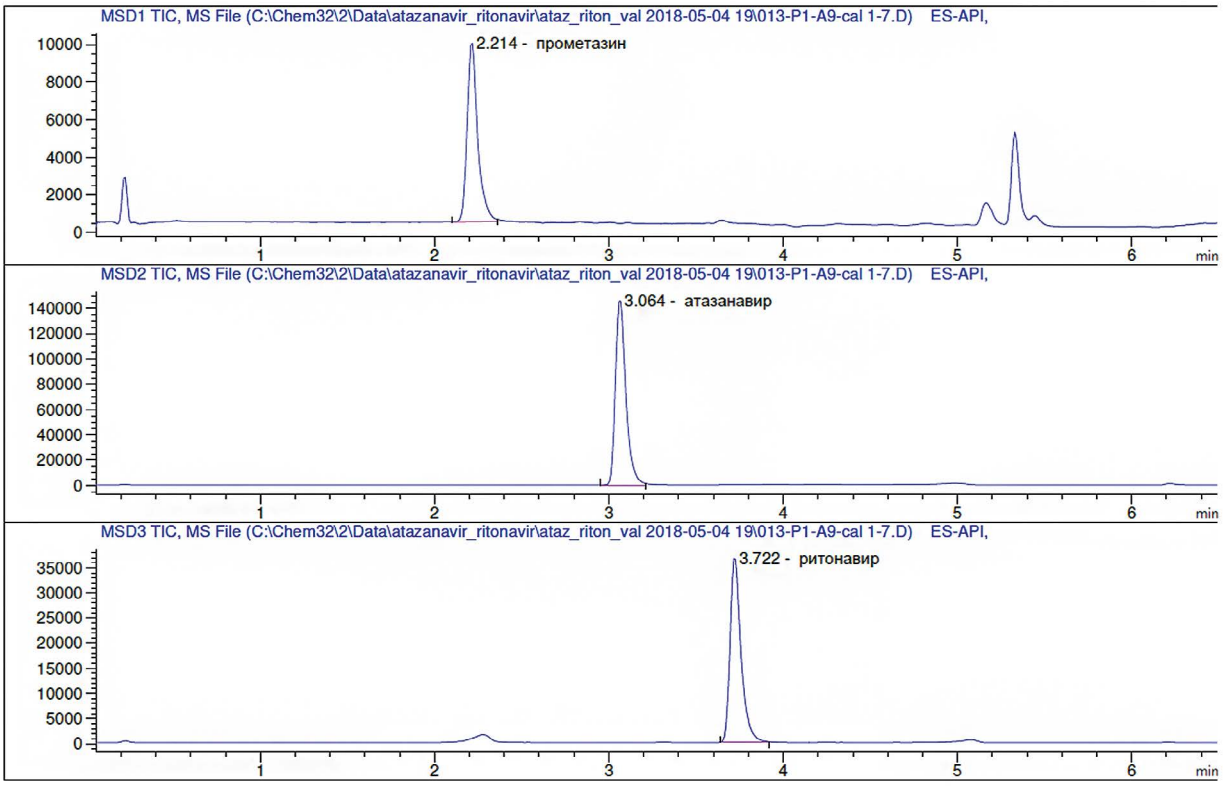

Рисунок 5. **Хроматограмма калибровочного образца плазмы крови, уровень № 7 (таблица № 2)**

Figure 5. **Chromatogram of calibration sample, level № 7 (table № 2)**

Таблица 5. **Расчёт фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта**

Table 5. **Calculation of the matrix factor of the analyzed substances, normalized by the matrix factor of internal standards**

№	Mf атазанавира (100,0 нг/мл)	Mf прометазина (500,0 нг/мл)	Нормализованный Mf	№	Mf атазанавира (10000,0 нг/мл)	Mf прометазина (500,0 нг/мл)	Нормализованный Mf
1	1,18	1,00	1,18	1	0,99	1,01	0,98
2	1,15	1,03	1,12	2	1,00	1,01	0,99
3	1,13	1,01	1,12	3	1,00	1,01	0,99
4	1,14	1,03	1,11	4	1,00	1,01	0,98
5	1,14	1,02	1,11	5	0,99	1,02	0,97
6	1,12	1,02	1,00	6	0,99	1,04	0,95
Среднее			1,12		**Среднее**		0,98
CV, %			2,70		**CV, %**		1,41
№	**Mf ритонавира (25,0 нг/мл)**	**Mf прометазина (500,0 нг/мл)**	**Нормализованный Mf**	**№**	**Mf ритонавира (2500,0 нг/мл)**	**Mf прометазина (500,0 нг/мл)**	**Нормализованный Mf**
1	1,52	1,00	1,53	1	1,30	1,01	1,29
2	1,54	1,03	1,50	2	1,30	1,01	1,29
3	1,54	1,01	1,52	3	1,33	1,01	1,31
4	1,48	1,03	1,44	4	1,31	1,01	1.29
5	1,57	1,02	1,54	5	1.33	1,02	1,30
6	1,48	1,02	1,45	6	1,32	1,04	1,28
Среднее			1,49		**Среднее**		1,29
CV, %			2,77		**CV, %**		0,95

Таблица 6. **Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график № 1**

Table 6. **Deviations of analyte concentrations in calibration samples from their nominal values, calibration chart № 1**

Концентрация атазанавира номинальная, нг/мл	Концентрация атазанавира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %	Концентрация ритонавира номинальная, нг/мл	Концентрация ритонавира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %
50,0	52,2	4,3	20	10,0	10,3	3,0	20
100,0	103,0	3,0	15	25,0	27,2	8,8	15
250,0	243,4	–2,7	15	50,0	51,9	3,8	15
500,0	483,6	–3,3	15	100,0	102,1	2,1	15
1000,0	1043,0	4,3	15	250,0	251,3	0,5	15
2500,0	2643,8	5,8	15	500,0	511,36	2,3	15
5000,0	4982,9	–0,3	15	1000,0	954,69	–4,5	15
10000,0	9812,6	–1,87	15	2500,0	2479,7	–0,81	15

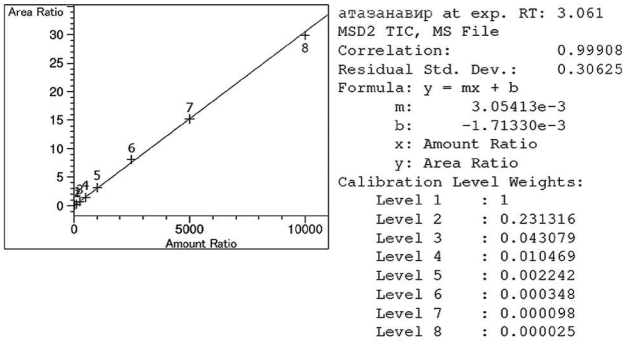

Рисунок 6. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика атазанавира к площади пика прометазина от отношения концентрации атазанавира к концентрации прометазина плазме крови**

Figure 6. **The calibration curve dependence of the ratio area peak of atazanavir to the promethazine on the concentration ratio of atazanavir to the promethazine in plasma**

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням: НПКО (см. таблицу 2, № 1) , низкий уровень (см. таблицу 2, № 2), средний уровень (см. таблицу 2, № 7), верхний уровень (см. таблицу 2, № 8). Анализ валидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точности и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (*E*, %), приведенные в таблице 7.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За нПКО методики принималась минимальная концентрация веществ в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение веществ со значениями RSD и E не более 20 %.

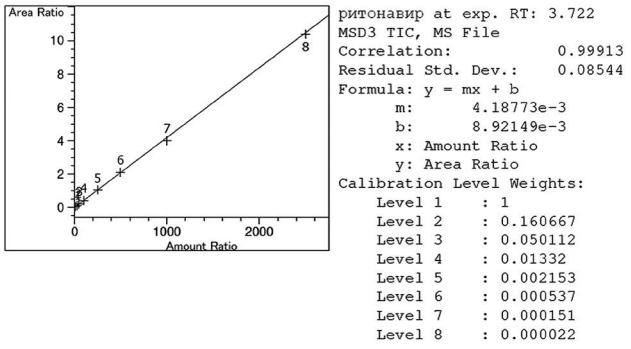

Рисунок 7. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ритонавира к площади пика прометазина от отношения концентрации ритонавира к концентрации ритонавира в плазме крови

Figure 7. The calibration curve dependence of the ratio area peak of ritonavir to the promethazine on the concentration ratio of ritonavir to the promethazine in plasma

Нижний предел количественного определения методики атазанавира и ритонавира составил 50,0 нг/мл и 10,0 нг/мл соответственно. Хроматограмма плазмы крови с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО приведена на рисунке 8.

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 42 дней при температуре –45 °С), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 42 дней при температуре –45 °С) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и внутреннего стандарта с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,0–10000,0 нг/мл в плазме крови для атазанавира, 10,0–2500,0 нг/мл в плазме крови для ритонавира. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих атазанавир и ритонавир.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева Н. Н., Ефимов Е. И., Солнцев Л. А. Электронный атлас в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией. *Медицинский альманах*. 2014; 4(34): 63–67.
2. Эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России. Available at: http://www.cgemo.ru/doks/news/epid-vich-2017.pdf.
3. Олейник А. Ф., Фазылов В. Х. Антиретровирусная терапия как метод профилактики ВИЧ-инфекции. *Инфекционные болезни: новости, мнение, обучение*. 2016; 3(6): 113–117.
4. Severe P., Juste M. A. J, Ambroise A., Eliacin L., Marchand C., Apollon S., Edwards A., Bang H., Nicotera J., Godfrey C., Gulick R. M., Johnson W. D., Pape J. W., Fitzgerald D. W. Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *New England Journal of Medicine*. 2010; 3(363): 257–265. DOI: 10.1056/NEJMoa0910370.
5. Кравченко А. В. Безопасность и эффективность применения атазанавира в составе современных схем АРВТ. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2010; 17: 220–235.
6. Guaraldi G., Cocchi S., Motta A., Ciaffi S., Codeluppi M., Bonora S., Benedetto F. D., Masetti M., Floridia M., Baroncelli S., Pinetti D., D'Avolio A., Bertolini A., Esposito R. A pilot study on the efficacy, pharmacokinetics and safety of atazanavir in patients with end-stage liver disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 6(62): 1356–1364. DOI: 10.1093/jac/dkn383.

Таблица 7. Точность и прецизионность методики определения атазанавира и ритонавира (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Table 7. Accuracy and precision of atazanavir and ritonavir determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение			SD			RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
Атазанавир												
50,0	51,5	51,2	51,2	0,7	0,9	0,8	1,4	1,7	1,6	3,1	2,4	2,4
100,0	98,6	98,1	98,3	1,3	1,2	1,1	1,3	1,2	1,1	–1,5	–1,9	–1,7
5000,0	4804,9	4886,1	4912,0	54,8	96,9	53,6	1,1	2,0	1,1	–3,9	–2,3	–1,8
10000,0	9722,7	9810,4	9864,5	43,4	120,9	49,2	0,5	1,2	0,5	–2,8	–1,9	-1,3
Ритонавир												
10,0	10,5	10,2	10,0	0,7	0,6	0,4	6,8	5,4	4,4	4,9	2,4	0,4
25,0	26,8	26,3	26,5	0,5	0,7	1,7	1,9	2,6	5,1	7,8	5,1	6,1
1000,0	936,9	944,7	949,6	21,3	21,2	24,1	2,3	2,3	2,5	–6,3	–5,5	–5,0
2500,0	2495,2	2507,9	2506,8	18,1	30,3	23,4	0,7	1,2	0,9	–0,2	0,3	0,3

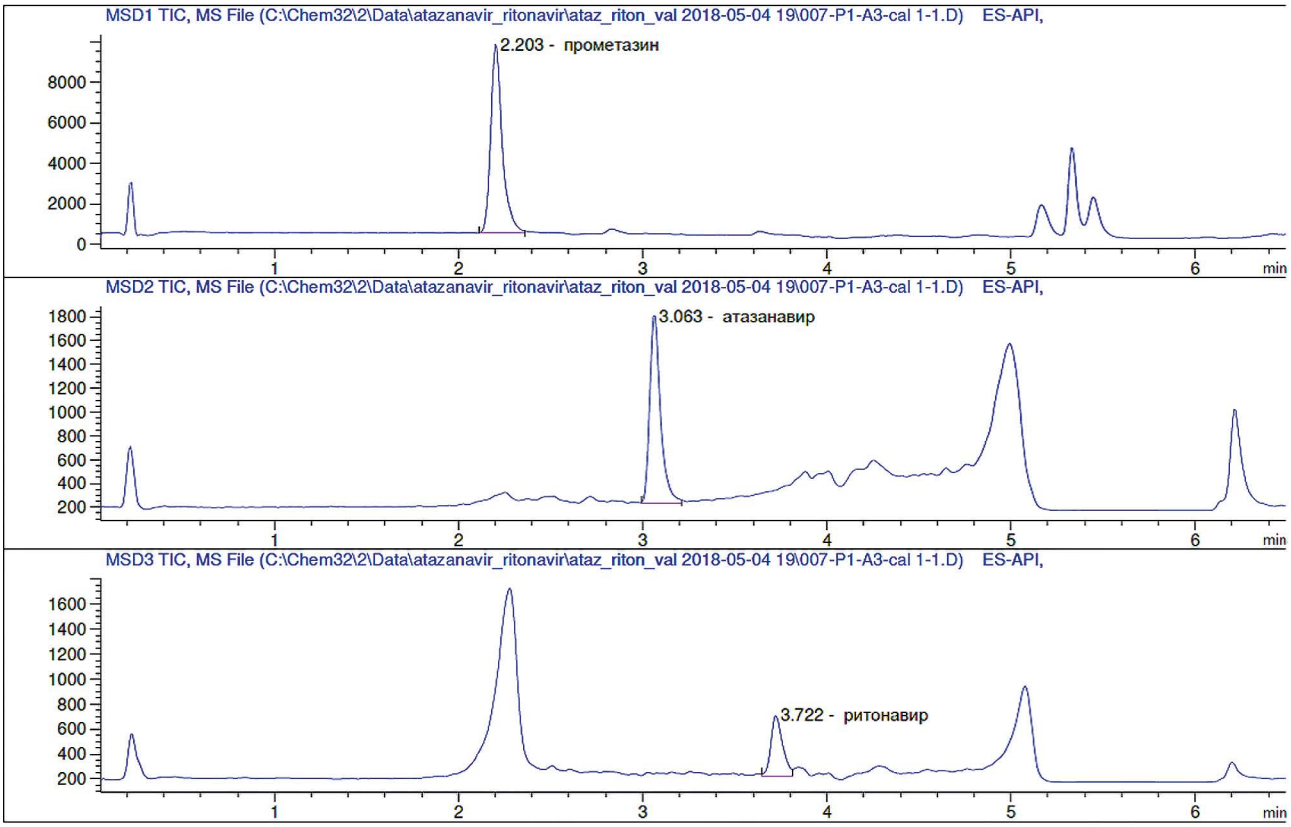

Рисунок 8. Хроматограмма образца с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО

Figure 8. Chromatogram of the sample with the content of the studied substances at the LLOQ level

7. Wempe M. F., Anderson P. L. Atazanavir metabolism according to CYP3A5 status: an in vitro-in vivo assessment. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011; 3(39): 522–527. DOI: 10.1124/dmd.110.036178.
8. Противовирусные препараты для лечения ВИЧ-инфекции: Ингибиторы протеаз. Available at: http://medzai.net/substances/atazanavir.php.
9. Hull M. W., Montaner J. S. G. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. *Annals of medicine*. 2011; 5(43): 375–388. DOI: 10.3109/07853890.2011.572905.
10. Busti A. J., Hall R. G., Margolis D. M. Atazanavir for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2004; 12(24): 1732–1747. DOI: 10.1592/phco.24.17.1732.52347.
11. Cateaua E., Tourniera N., Dupuisb A., Moalc G. L., Venisse N. Determination of atazanavir in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005; 3-4(39): 791–795. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.04.025.
12. Cattaneo D., Maggiolo F., Ripamonti D., Perico N.. Determination of atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of chromatographic science*. 2008; 6(46): 485–489. DOI: 10.1093/chromsci/46.6.485.
13. Кушакова А. С., Никитина Д. А., Новиков А. В. Методика определения концентрации атазанавира в плазме крови человека методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием. *Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез*. Материалы III Всероссийской конференции; 2017 21–27 мая, Краснодар, Россия. Краснодар: Кубанский государственный университет. 2017: 88.
14. Reddy A.V.B., Jaafar J., Aris A.B., Majid Z.A., Umar K., Talib J., Madhavi G. Development and validation of a rapid ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of darunavir, ritonavir, and tenofovir in human plasma: Application to human pharmacokinetics. *Journal of separation science*. 2015; 15(38): 2580–2587. DOI: 10.1002/jssc.201500250.
15. Mishra T., Shrivastav P. S. Validation of simultaneous quantitative method of HIV protease inhibitors atazanavir, darunavir and ritonavir in human plasma by UPLC-MS/MS. The *Scientific World Journal*. 2014. DOI: 10.1155/2014/482693.
16. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: *Гриф и К*. 2013: 280.
17. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
18. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation.
19. Reyataz. Available at: https://packageinserts.bms.com/pi/pi_reyataz.pdf.

REFERENCES

1. Zaitseva N. N., Efimov E. I., Solntsev L. A. Electronic Atlas in HIV Surveillance. *Medical almanac*. 2014; 4(34): 63–67 (in Russ.).
2. The epidemiological situation of HIV infection in Russia. Available at: http://www.cgemo.ru/doks/news/epid-vich-2017.pdf (in Russ.).
3. Oleinik A. F., Fazylov V. Kh. Antiretroviral therapy as a method of preventing HIV infection. *Infectious diseases: news, opinion, education*. 2016; 3(6): 113–117 (in Russ.).

4. Severe P., Juste M. A. J, Ambroise A., Eliacin L., Marchand C., Apollon S., Edwards A., Bang H., Nicotera J., Godfrey C., Gulick R. M., Johnson W. D., Pape J. W., Fitzgerald D. W. Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *New England Journal of Medicine*. 2010; 3(363): 257–265. DOI: 10.1056/NEJMoa0910370.
5. Kravchenko A. V. Safety and efficacy of atazanavir as part of modern ART regimens. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2010; 17: 220–235 (in Russ.).
6. Guaraldi G., Cocchi S., Motta A., Ciaffi S., Codeluppi M., Bonora S., Benedetto F.D., Masetti M., Floridia M., Baroncelli S., Pinetti D., D'Avolio A., Bertolini A., Esposito R. A pilot study on the efficacy, pharmacokinetics and safety of atazanavir in patients with end-stage liver disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 6(62): 1356–1364. DOI: 10.1093/jac/dkn383.
7. Wempe M. F., Anderson P. L. Atazanavir metabolism according to CYP3A5 status: an in vitro-in vivo assessment. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011; 3(39): 522–527. DOI: 10.1124/dmd.110.036178.
8. Antivirals for HIV: Protease Inhibitors. Available at: http://medzai.net/substances/atazanavir.php (in Russ.).
9. Hull M. W., Montaner J. S. G. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. *Annals of medicine*. 2011; 5(43): 375–388. DOI: 10.3109/07853890.2011.572905.
10. Busti A. J., Hall R. G., Margolis D. M. Atazanavir for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2004; 12(24): 1732–1747. DOI: 10.1592/phco.24.17.1732.52347.
11. Cateaua E., Tourniera N., Dupuisb A., Moalc G.L., Venisse N. Determination of atazanavir in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005; 3-4(39): 791–795. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.04.025.
12. Cattaneo D., Maggiolo F., Ripamonti D., Perico N. Determination of atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of chromatographic science*. 2008; 6(46): 485–489. DOI: 10.1093/chromsci/46.6.485.
13. Kushakova A. S., Nikitina D. A., Novikov A. V. Method for determining the concentration of atazanavir in human blood plasma by RP-HPLC with UV detection. *Analytical chromatography and capillary electrophoresis*. Materials of the III All-Russian Conference; 2017 May 21–27, Krasnodar, Russia. Krasnodar: Kuban State University; 2017: 88 (in Russ.).
14. Reddy A. V. B., Jaafar J., Aris A. B., Majid Z. A., Umar K., Talib J., Madhavi G. Development and validation of a rapid ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of darunavir, ritonavir, and tenofovir in human plasma: Application to human pharmacokinetics. *Journal of separation science*. 2015; 15(38): 2580–2587. DOI: 10.1002/jssc.201500250.
15. Mishra T., Shrivastav P. S. Validation of simultaneous quantitative method of HIV protease inhibitors atazanavir, darunavir and ritonavir in human plasma by UPLC-MS/MS. The *Scientific World Journal*. 2014. DOI: 10.1155/2014/482693.
16. Mironov A.N. Guidelines for the examination of medicines. T. II. M.: *Grif and K*. 2013: 280 (in Russ.).
17. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
18. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation.
19. Reyataz. Available at: https://packageinserts.bms.com/pi/pi_reyataz.pdf.