

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

КАРЛИНА
Вера Юрьевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ОРИГИНАЛЬНОГО
ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА «ПЕРХЛОЗОН»

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

Москва –2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Туберкулёз. Эпидемиологическая ситуация и химиотерапевтическое лечение.....	9
1.2 Клиническое исследование оригинального лекарственного средства.....	10
1.3 Аналитические методы исследования фармакокинетики.....	13
1.4 Валидация биоаналитических методик.....	15
1.5 Аналитические подходы к определению перхлозона.....	22
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	30
ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРХЛОЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ.....	31
2.1 Материалы и методы.....	31
2.2 Результаты и их обсуждение.....	33
ГЛАВА 3. ПЕРЕНОС МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРХЛОЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ	39
3.1 Материалы и методы.....	40
3.2 Результаты и их обсуждение.....	42
ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ОРИГИНАЛЬНОГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНОГО ПРЕПАРАТА «ПЕРХЛОЗОН».....	48
4.1 Дизайн исследования.....	48
4.2 Результаты и их обсуждение.....	49
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В настоящее время в Российской Федерации сохраняется сложная эпидемиологическая обстановка по туберкулезу [1-3].

Химиотерапия является основой комплексного лечения и ключевым фактором выздоровления больных различными формами туберкулеза, значительного снижения летальности, уменьшения резервуара туберкулезной инфекции.

В Российской Федерации начиная с 50-х гг. для лечения туберкулеза применяются изониазид, пиразинамид, стрептомицин, канамицин, капреомицин, протионамид, циклосерин и ПАСК [6], рифампицин и этамбутол – с 70-х гг. [7] и только фторхинолоны – с конца 90-х гг. XX в. [8].

Распространение штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (устойчивые, по крайней мере, к изониазиду и рифампицину) поставило под сомнение успех противотуберкулезных мероприятий [9] и повлекло за собой снижение эффективности химиотерапии [10, 11, 13, 14]. На фоне вынужденной полихимиотерапии с использованием резервных противотуберкулезных препаратов (протионамид (этионамид), канамицин, амикацин, капреомицин, циклосерин, рифабутин, ПАСК, фторхинолоны) уменьшается функциональная активность защитных систем организма и отмечаются побочные реакции со стороны различных органов и систем, что ведёт к затяжному течению заболевания и хронизации воспалительных процессов. В этих условиях становится очевидной необходимость создания инновационных лекарственных препаратов для борьбы с устойчивыми штаммами микобактерий туберкулёза.

«Перхлозон» – оригинальный противотуберкулезный лекарственный препарат, разработанный в России Иркутским институтом химии имени А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской Академии наук (СО РАН) и

Федеральным государственным бюджетным учреждением «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» совместно с открытым акционерным обществом «Фармасинтез». Новый препарат был представлен на Всемирной конференции «Против туберкулеза и заболеваний легких» [69, 70]. Премьер-министр России Дмитрий Медведев на совещании в Российском инновационном центре «Сколково» назвал препарат «Перхлозон», разработанный компанией «Фармасинтез», среди прорывных в отечественной медицине [71].

Разработка методики определения перхлозона в плазме крови и последующее изучение фармакокинетики данного инновационного лекарственного средства являются важнейшей задачей с целью внедрения препарата в медицинскую практику. Данные о фармакокинетике используются при составлении схемы рациональной терапии, позволив правильно рассчитать дозу препарата, кратность приёма, добиться максимального терапевтического эффекта с минимальным риском возникновения нежелательных лекарственных реакций.

Все вышесказанное определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования – изучить фармакокинетику оригинального противотуберкулёзного препарата «Перхлозон».

Задачи исследования:

1. сделать научно-обоснованный выбор аналитического метода определения перхлозона в плазме крови;
2. разработать методику количественного определения перхлозона в плазме крови;
3. провести валидацию методики определения перхлозона в плазме крови;
4. осуществить межлабораторный перенос методики определения перхлозона в плазме крови;

5. изучить динамику концентраций и фармакокинетику инновационного противотуберкулёзного препарата «Перхлозон»;
6. провести терапевтический лекарственный мониторинг на фоне курсового лечения перхлозоном.

Научная новизна

В работе впервые изучена фармакокинетика инновационного противотуберкулёзного препарата «Перхлозон», капсулы 400 мг и получены значения равновесной концентрации перхлозона в плазме крови человека при курсовом приёме препарата. По результатам экспериментов показано, что разработанная методика может быть применена для проведения терапевтического мониторинга на фоне курсового лечения перхлозоном в сочетании с другими противотуберкулёзными препаратами.

Практическая значимость

Разработанные при выполнении диссертационного исследования методики были успешно применены в открытом исследовании I фазы по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости препарата «Перхлозон» (капсулы 400 мг) у здоровых добровольцев при однократном применении (протокол № PERHL-11-2011), а также в открытом сравнительном рандомизированном многоцентровом исследовании эффективности и безопасности препарата «Перхлозон» в комплексной терапии больных туберкулезом легких (протокол П02/10).

Разработанная методика определения перхлозона в плазме крови, а также ее перенос на хроматографическую станцию Agilent 1200 внедрены в международную базу практических руководств по применению аналитических методик Agilent Application Notes (руководства №№ 5991-3216RURU и 5991-2997RURU).

Апробация работы

Апробация работы проведена на научном совете НИИ Фармации Первого МГМУ имени И.М. Сеченова 10 ноября 2015.

Результаты работы представлены и обсуждены на научной конференции ученых НИИ Фармации и кафедре фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета Первого МГМУ им.И.М.Сеченова, а также на научно-практической конференции с международным участием «Сравнительный тест кинетики растворения, фармакокинетика и биоэквивалентность: актуальные новости и взгляды» (ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», 2014).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведена разработка, валидация и перенос методики определения перхлорона в плазме крови, статистическая обработка результатов. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально - теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения в практику.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 4 паспорта специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 6 работ, в том числе 2 в изданиях из Перечня ВАК.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы НИИ Фармации Первого МГМУ имени И.М. Сеченова «Разработка современных технологий подготовки специалистов с высшим медицинским и фармацевтическим образованием на основе достижений медико-биологических исследований», номер государственной регистрации 01200606352.

Положения, выносимые на защиту

1. Методика количественного определения перхлозона в плазме крови методом ион-парной ВЭЖХ с УФ-детектированием.
2. Фармакокинетические параметры препарата «Перхлозон» у здоровых добровольцев после однократного перорального приема.
3. Значения равновесной концентрации перхлозона у больных туберкулезом легких на фоне комплексной противотуберкулезной терапии.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 127 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), разработки и валидации методики определения перхлозона в плазме крови (2 глава), переноса методики определения перхлозона в плазме крови (3 глава), применения разработанной методики для исследования фармакокинетики оригинального противотуберкулезного препарата «Перхлозон» (4 глава),

общих выводов и списка литературы. Диссертация включает 12 таблиц и 81 рисунок. Библиографический список содержит 109 источников, из них 76 на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Туберкулёз. Эпидемиологическая ситуация и химиотерапевтическое лечение

В настоящее время в Российской Федерации сохраняется сложная эпидемиологическая обстановка по туберкулезу [1-3]. По данным на 2011 год остаются на невысоком уровне показатели эффективности лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких: прекращение бактериовыделения составило 66,6%; закрытие полости распада – 58,5%; летальность – 7,1%, смертность – 17,9%, доля впервые выявленных больных с множественной лекарственной устойчивостью составила 19,4% [2].

Химиотерапия является основой комплексного лечения и ключевым фактором выздоровления больных различными формами туберкулеза, значительного снижения летальности, уменьшения резервуара туберкулезной инфекции. При своевременно начатом лечении и правильном подходе к терапии впервые выявленный туберкулез в абсолютном большинстве случаев излечивается.

К основным противотуберкулёзным препаратам относятся изонизид, рифампицин, пиперазид, этамбутол и стрептомицин. Эти препараты оказывают эффективное бактерицидное действие на *Mycobacterium tuberculosis* и демонстрируют наименьшую частоту нежелательных лекарственных реакций. Основные противотуберкулёзные препараты используются для лечения впервые выявленных больных туберкулезом [4, 5].

Группу резервных противотуберкулёзных препаратов составляют канамицин (амикацин), капреомицин, протионамид, циклосерин, парааминосалициловая кислота (ПАСК) и фторхинолоны. Эти препараты оказывают менее эффективное бактериостатическое действие на *Mycobacterium tuberculosis* и являются заменой основным

противотуберкулёзным препаратам в случае выявления лекарственной устойчивости и неустрашимых побочных реакций [4].

В Российской Федерации начиная с 50-х гг. для лечения туберкулеза применяются изониазид, пиразинамид, стрептомицин, канамицин, капреомицин, протионамид, циклосерин и ПАСК [6], рифампицин и этамбутол – с 70-х гг. [7] и только фторхинолоны – с конца 90-х гг. XX в. [8].

Распространение штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (устойчивые, по крайней мере, к изониазиду и рифампицину) поставило под сомнение успех противотуберкулёзных мероприятий [9] и повлекло за собой снижение эффективности химиотерапии [10,11, 13, 14]. На фоне вынужденной полихимиотерапии с использованием резервных противотуберкулёзных препаратов уменьшается функциональная активность защитных систем организма и отмечаются побочные реакции со стороны различных органов и систем, что ведёт к затяжному течению заболевания и хронизации воспалительных процессов. В этих условиях становится очевидной необходимость создания инновационных лекарственных препаратов для борьбы с устойчивыми штаммами микобактерий туберкулёза.

1.2 Клиническое исследование оригинального лекарственного средства

Оригинальное лекарственное средство - лекарственное средство, содержащее впервые полученную фармацевтическую субстанцию или новую комбинацию фармацевтических субстанций, эффективность и безопасность которых подтверждены результатами доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов [15].

Одним из обязательных этапов государственной регистрации оригинального препарата является его клиническое исследование в одной или нескольких медицинских организациях.

Клиническое исследование лекарственного препарата – изучение диагностических, лечебных, профилактических, фармакологических свойств лекарственного препарата в процессе его применения у человека, животного, в том числе процессов всасывания, распределения, изменения и выведения, путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного препарата, данных о нежелательных реакциях организма человека, животного на применение лекарственного препарата и об эффекте его взаимодействия с другими лекарственными препаратами и (или) пищевыми продуктами, кормами [15].

Клинические исследования должны проводиться в соответствии с правилами Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice; GCP), которые представляют собой международный этический и научный стандарт планирования и проведения исследований с участием человека в качестве субъекта, а также документального оформления и представления результатов таких исследований [16, 17].

Клинические исследования лекарственных препаратов для медицинского применения проводятся в следующих целях:

- 1) установление безопасности лекарственных препаратов для здоровых добровольцев и (или) переносимости их здоровыми добровольцами.
- 2) подбор оптимальных дозировок лекарственного препарата и курса лечения для пациентов с определенным заболеванием.
- 3) установление безопасности лекарственного препарата и его эффективности для пациентов с определенным заболеванием [15].

Существуют три основных типа дизайна клинических исследований: параллельное, перекрестное и факториальное [18]. Клиническое исследование обычно принято разделять на 4 фазы [19].

Фаза I

На данном этапе проводится изучение фармакокинетических свойств (всасывание, распределение, метаболизм и выведение), безопасности и переносимости лекарственного средства. Исследование первой фазы проводят на небольшой группе здоровых добровольцев, но в случае, если препарат обладает высокой потенциальной токсичностью или обладает цитотоксическим фармакологическим действием, в исследовании участвуют пациенты с соответствующим заболеванием. Иногда проводится предварительное исследование фармакокинетики препарата при введении микродоз на маленькой выборке [19, 20].

На первой фазе при однократном введении препарата определяются следующие фармакокинетические параметры [21-24]:

1. Значения площади под кривыми "концентрация-время" (AUC)
2. Максимальная концентрация в плазме (C_{max})
3. Время достижения максимальной концентрации (T_{max})
4. Период полувыведения ($T_{1/2}$)
5. Время удерживания вещества в плазме (MRT)
6. Показатель скорости всасывания (C_{max}/AUC)
7. Константа элиминации (k_{el})

Данные о фармакокинетики, переносимости и токсичности препарата используются на последующих стадиях клинического исследования для выбора оптимального режима дозирования и кратности приёма исследуемого препарата.

Фаза II

В исследованиях второй фазы принимают участия пациенты с соответствующим заболеванием. Целью исследования на данном этапе является определение терапевтической дозы. Важная задача второй фазы – подбор доз, которые будут использоваться в исследовании третьей фазы. Обычно дозы во второй фазе меньше, чем высшие дозы в **Фазе I**.

Фаза III

В исследованиях третьей фазы продолжается изучение безопасности и терапевтической эффективности лекарственного препарата на большей популяции, чем во второй фазе исследования. Цель третьей фазы – подтверждение результатов исследования фазы II.

Изучение фармакокинетических свойств лекарственного средства может продолжаться при исследованиях фазы II и III.

Фаза IV

Четвёртая фаза клинического исследования проводится после регистрации лекарственного препарата. На этом этапе изучается терапевтическое применение лекарственного средства, безопасность и эффективность которого была установлена в течение предыдущих фаз исследования [19].

1.3 Аналитические методы исследования фармакокинетики

Для проведения качественного исследования фармакокинетики необходимо правильно выбрать аналитический метод, который должен обладать высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью. Также следует учитывать, что большой объём проб при фармакокинетическом исследовании требует высокой скорости проведения анализа. В разной степени этим требованиям удовлетворяют высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газожидкостная хроматография (ГЖХ) и иммуноферментный анализ (ИФА) [25]. Однако наиболее часто в исследованиях фармакокинетики сейчас используются ВЭЖХ и сверхвысокопроизводительная высокоэффективная жидкостная хроматография (СВЭЖХ) [26].

Газо-жидкостная хроматография позволяет достигнуть высокой эффективности разделения компонентов пробы, обеспечивает хорошую чувствительность и селективность, но накладывает существенные

ограничения по термостабильности исследуемых веществ, либо требует их дериватизации. Требуется тщательная пробоподготовка, позволяющая избавиться от термолабильных эндогенных веществ, высокомолекулярных соединений, мешающих анализу методом ГЖХ. При выполнении данных условий ГЖХ может быть использована для исследования фармакокинетики [27-32].

Подобных ограничений по природе анализируемых веществ не накладывают ВЭЖХ и СВЭЖХ. Могут применяться различные методы детектирования, самыми распространёнными из которых являются спектрофотометрический, флуоресцентный и масс-спектрометрический (МС).

Наибольшее распространение имеет спектрофотометрическое детектирование [33-41], однако оно не всегда достаточно специфично. Гораздо большей селективностью и чувствительностью обладает флуоресцентный детектор. Для его использования обязательным требованием является способность вещества флуоресцировать или возможность проведения дериватизации для приобретения молекулой этого свойства [42-45].

Самым чувствительным и селективным является масс-спектрометрический детектор. Его применение позволяет упростить пробоподготовку и сократить время анализа. Существуют различные режимы детектирования: ТИС (total ion current) – анализ полного ионного тока, СИМ (selected ion monitoring) – определение заданных ионов, МРМ (multiple reaction monitoring) – мониторинг множественных реакций в варианте тандемной масс-спектрометрии. Последний способ более предпочтителен и позволяет достигать наибольшей селективности, исключая интерференцию целевых пиков с пиками эндогенных соединений [46]. ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС - это одни из наиболее современных и часто применяемых в исследованиях фармакокинетики аналитических методов [46-55].

Существенным недостатком ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС является сложность и дороговизна оборудования.

Метод ИФА обладает высокой чувствительностью и селективностью, требует малых объёмов исследуемого материала. Разработаны автоматизированные системы анализа, делающие процедуру ИФА простой и быстрой. Однако применение метода существенно ограничивается тем, что далеко не для всех лекарственных веществ производятся специфические антитела, тем более в случае оригинальных, недавно синтезированных лекарственных средств. Тем не менее, опубликовано много работ по исследованию фармакокинетики с использованием ИФА [56, 57].

1.4. Валидация биоаналитических методик

При разработке биоаналитической методики определения оригинального лекарственного препарата требуется проведение её полной валидации [60-64]. Целью валидации является подтверждение надёжности методики для определения концентрации анализируемого вещества в биологических матрицах. Основными руководствами по проведению валидации являются руководство для предприятий U.S. FDA 2001 г. [58] и руководство Европейского Медицинского Агентства (ЕМА) 2011 г [59], причём требования ЕМА можно считать более строгими и современными. Остальные руководства в той или иной степени копируют требования FDA и ЕМА с незначительными изменениями и дополнениями [62-65]. В 2013 году в России было выпущено «Руководство по экспертизе лекарственных средств» в двух частях, его требования идентичны рекомендациям ЕМА [66, 67].

Руководство FDA рекомендует проводить валидацию, определяя следующие характеристики: селективность, правильность, прецизионность, степень извлечения, калибровочную кривую и стабильность.

Селективность – способность аналитической методики обнаруживать и количественно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов пробы. При испытании селективности чистые образцы биологической жидкости должны быть получены не менее чем из 6 источников. Исследуемое вещество не должно испытывать влияния посторонних компонентов биологической матрицы, пики на хроматограмме не должны накладываться. Селективность методики должна быть подтверждена при концентрациях, равных пределу количественного определения (ПКО). По требованиям ЕМА максимально допустимое мешающее влияние посторонних веществ на определяемое вещество и внутренний стандарт может составлять не более 20% от ПКО определяемого вещества. В «Методических рекомендациях по изучению биоэквивалентности» [64] устанавливается допустимое мешающее влияние посторонних веществ не более 20% от ПКО для определяемого вещества и не более 5% от ПКО для внутреннего стандарта.

Правильность – близость среднего результата испытания к номинальному значению концентрации анализируемого вещества. Правильность определяется повторяющимся анализом образцов, содержащих известное количество анализируемого вещества. Необходимо проводить минимум 5 измерений при каждой концентрации. Среднее значение от номинального должно быть в пределах 15% и в пределах 20% для ПКО. ЕМА уточняет, что правильность должна определяться минимум на 4 уровнях концентрации: для ПКО, для точки, в 3 раза большей ПКО, около 50% от диапазона калибровочной кривой и около 75% от максимального значения на калибровочной кривой. Правильность предлагается определять на двух уровнях: внутри одной последовательности анализа и между последовательностями в течение минимум двух разных дней.

Прецизионность методики описывает близость повторяемых индивидуальных измерений, выражается как относительное стандартное

отклонение. Для определения прецизионности необходимо минимум 5 повторений на каждом уровне концентрации. Значения относительного стандартного отклонения не должны превышать 15% на всех уровнях концентрации и 20% при ПКО. Прецизионность определяется в течение одного и нескольких рабочих дней. ЕМА рекомендует определять прецизионность на 4 уровнях концентрации (по аналогии с определением правильности).

Руководство ЕМА предъявляет более строгие требования к определению правильности и прецизионности, регламентируя определение данных характеристик при концентрации, равной ПКО, что гарантирует высокое качество количественного при низких концентрациях, например, в случае изучения кинетики выведения лекарственного препарата.

Степень извлечения - отношение отклика детектора пробы биологической жидкости с прибавленным раствором определяемого вещества после извлечения к отклику детектора для стандартного раствора этого вещества такой же концентрации. Степень извлечения не может быть 100%, но должна быть воспроизводимой. В ходе разработки методики всегда стараются добиться максимально возможной степени извлечения. Рекомендуется определять степень извлечения на 3 уровнях концентрации (низкий, средний, высокий) [58].

Калибровочная (стандартная) кривая является зависимостью между откликом прибора и известной концентрацией. Образцы для построения калибровочной кривой должны готовиться с применением той же биологической жидкости, которая фигурирует в исследовании. Калибровочная кривая должна состоять из чистого образца биологической матрицы (бланк), нулевого образца (бланк с добавлением внутреннего стандарта) и от 6 до 8 ненулевых точек, включая ПКО, находящихся в желаемом диапазоне концентраций.

Величина относительной погрешности рассчитанных по калибровочной кривой концентраций не должна отличаться от номинальной для ПКО не более, чем на 20 % и 15% для остальных точек. Данное условие должно соблюдаться для не менее чем 4 образцов из 6 (FDA) или не менее чем для 75 % образцов, но не менее 6 (EMA). Обычно калибровочная кривая отражает линейную зависимость отклика прибора от концентрации определяемого вещества, однако это не является обязательным условием. Допускается использование для описания калибровочной зависимости любого математического закона, если он адекватно её отражает и если отклонения концентраций калибровочных растворов укладываются в допустимые нормы.

Нижний предел количественного обнаружения (НПКО) – минимальная концентрация анализируемого вещества, для которой значения правильности и прецизионности находятся в пределах 20%. Соотношение сигнал-шум должно составлять не менее 5 [58] или не менее 10 по ОФС 42-0113-09 [62]. При этом ПКО не является пределом обнаружения вещества по валидируемой методике, качественное обнаружение возможно и при более низких концентрациях определяемого вещества. В исследованиях биоэквивалентности значение НПКО должно составлять 5% от ожидаемой максимальной концентрации, то есть в 20 раз меньше, чем C_{max} , тогда как при поисковых фармакокинетических исследованиях такое требование не обязательно и значение НПКО может быть выше, чем 1/20 от максимальной концентрации [66].

Стабильность. Исследование стабильности анализируемого вещества в биологической матрице проводят, чтобы подтвердить, что условия пробоподготовки, анализа и хранения образцов не влияют на концентрацию действующего вещества. Определяют следующие виды стабильности:

- **стабильность после замораживания и разморозки.** По 3 аликвоты образцов с низкой и высокой концентрацией определяемого вещества

подвергают трём циклам замораживания (предусмотренная методикой температура) и разморозки при комнатной температуре;

- **краткосрочная стабильность** анализируемого вещества в образцах при комнатной температуре определяется в течение 4 ч - 24 ч. Используют по 3 аликвоты образцов с низкой и высокой концентрацией определяемого вещества;
- **длительная стабильность** определяемого вещества в биологической жидкости при хранении в морозильнике при той же температуре, что и исследуемые образцы, анализируется с использованием 3 аликвот образцов с низкой и высокой концентрацией определяемого вещества. Время хранения образцов при испытании длительной стабильности должно превышать период от отбора первой пробы до анализа последнего образца;
- **стабильность исходного и рабочих растворов** стандартного вещества определяется в течение 6 часов при комнатной температуре. Если растворы подвергаются замораживанию, то после разморозки сравнивают отклик прибора для этих растворов с откликом свежеприготовленных. Стабильность исходного и рабочих растворов определяют после их разведения до концентрации, соответствующей линейному диапазону детектора;
- **стабильность приготовленных проб**, включая стабильность при хранении в автосамплере, определяют в течение периода времени, соответствующего ожидаемому сроку хранения образца в автосамплере при анализе одной последовательности.

При проведении испытаний стабильности величина относительной погрешности рассчитанных значений концентраций от номинальных не должна превышать 15 % [59]. При выполнении требований по стабильности допускается повторное использование приготовленных ранее калибровочных растворов, если срок и условия хранения не отличались от изученных.

Руководство ЕМА, отличающееся более строгими и конкретизированными требованиями, также рекомендует определение ещё двух валидационных характеристик:

- **допустимость разведения.** Разведение не должно влиять на правильность и прецизионность. Оценивается путём добавления к чистой биологической матрице стандарта определяемого вещества в количестве больше верхнего предела количественного определения и разбавления образца. Значения правильности и прецизионности должны находиться в пределах 15%;

- **эффект матрицы.** Оценивается при использовании масс-спектрометрического детектирования. 6 разных серий биологической матрицы отбирают для испытания. Сравнивают площади пиков в отсутствии и в присутствии биологической матрицы. Таким образом доказывают наличие или отсутствие влияния компонентов матрицы на эффективность процесса ионизации испытуемого вещества в масс-детекторе. Эффект матрицы может быть как усиливающим, так и ослабляющим ионизацию. При игнорировании эффекта матрицы в ходе исследования появляется риск получения недостоверных (завышенных или заниженных) результатов.

Анализ исследуемых образцов допустимо проводить только после проведения валидации методики. В течение каждого рабочего дня или в одной хроматографической последовательности дополнительно анализируют [59]:

- пробу чистой биологической матрицы;
- пробу чистой биологической матрицы с прибавлением внутреннего стандарта, если он используется;
- не менее 6 проб чистой биологической матрицы с прибавлением определяемого вещества в пределах калибровочной кривой (калибровочные стандарты);

- по 2 пробы чистой биологической матрицы, к каждой из которых прибавляют стандартный раствор определяемого вещества и внутреннего стандарта, если он используется, не менее чем на 3 уровнях концентраций (на нижней и верхней границах и в середине диапазона калибровочной кривой). Общее количество контрольных образцов, анализируемых в течение 1 рабочего дня (одной хроматографической последовательности), должно составлять не менее 5 % от общего количества анализируемых проб.

Рекомендуется проводить определение проб от одного добровольца в течение 1 рабочего дня (одной хроматографической последовательности). Допустимо проводить определение проб от нескольких добровольцев в течение 1 рабочего дня (одной хроматографической последовательности).

Результаты анализа серии проб, проанализированных в течение 1 рабочего дня (одной хроматографической последовательности) считаются достоверными, если [59]:

- Величина относительной погрешности рассчитанных концентраций калибровочных стандартов от номинальных для точки, соответствующей ПКО, не превышает 20 %, для остальных точек – 15 %. Данному критерию приемлемости должно соответствовать не менее 75 % от общего количества калибровочных стандартов, но не менее 6. Если несколько (но не более 25 %) калибровочных стандартов не соответствуют критерию приемлемости, то необходимо повторно рассчитать уравнение калибровочной кривой, при этом выпадающие результаты не учитывают. Если выпадающим результатом является проба, соответствующая ПКО, то за ПКО принимают следующую концентрацию калибровочного стандарта.
- Величина относительной погрешности рассчитанных значений концентраций от фактических для не менее 4 из 6 контрольных проб и

не менее 50 % контрольных проб на каждом из уровней концентраций не превышают 15 %.

Кроме того, величины относительной погрешности и относительного стандартного отклонения между рабочими днями или хроматографическими последовательностями для всех контрольных образцов не должны превышать 15 %. В случае несоответствия критерия приемлемости необходимо переделать все пробы, проанализированные в данный рабочий день (хроматографическую последовательность) [58, 59,68].

1.5 Аналитические подходы к определению перхлорона

«Перхлозон» – оригинальный противотуберкулезный лекарственный препарат, разработанный в России Иркутским институтом химии имени А.Е. Фаворского СО РАН и ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» совместно с ОАО «Фармасинтез». Новый препарат был представлен на Всемирной конференции «Против туберкулеза и заболеваний легких» [69, 70]. Премьер-министр России Дмитрий Медведев на совещании в российском инновационном центре «Сколково» назвал препарат «Перхлозон», разработанный компанией «Фармасинтез», среди прорывных в отечественной медицине [71].

1.5.1 Структура и физико-химические свойства

Перхлозон, или тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат, является по своей структуре перхлоратом тиосемикарбазона изоникотинового альдегида (рисунок 1).

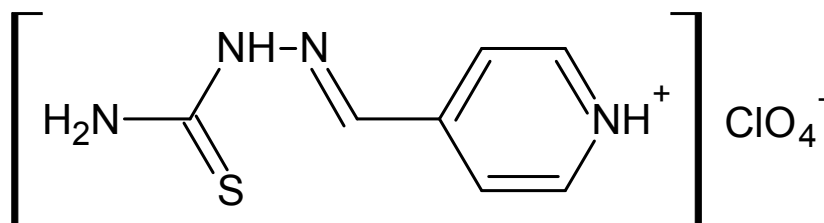


Рисунок 1. Структурная формула перхлозона.

Данные о физико-химических практически отсутствуют в литературе, так как перхлозон является новой молекулой, а фармакопейная статья предприятия не имеет открытого доступа. Перхлозон (в форме основания) демонстрирует незначительную гидрофобность (рассчитанное значение $\log P = 0,94$) и умеренную растворимость в воде (рассчитанное значение $\log S = -2,86$) [72]. Данные особенности перхлозона необходимо учитывать, как при пробоподготовке, так и при выборе метода и условий хроматографического разделения.

1.5.2 Существующие методики определения перхлозона

На данный момент в литературе описана всего одна методика определения перхлозона в плазме крови человека [73]. В своей работе А.М. Власов и др. предлагают использовать метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием.

Пробоподготовка выполнялась путём осаждения белков плазмы ацетонитрилом в соотношении 1:3 с дальнейшим центрифугированием, отделением супернатанта и концентрированием пробы.

Для детектирования использовался одноквадрупольный масс-анализатор, проводилось сканирование в режиме SIM. В этой связи особенно важно провести исследование матричного эффекта (Matrix effect) [59], доказать отсутствие мешающего влияния на пик определяемого вещества эндогенных компонентов в составе плазмы крови, однако в данной работе эта характеристика не была исследована в ходе валидации. Компоненты матрицы могут как уменьшать, так и увеличивать эффективность ионизации определяемого вещества на входе в масс-анализатор, соответственно, могут быть получены заниженные или завышенные значения концентраций. Искаженные первичные данные, полученные без учёта эффекта матрицы, далее используются при расчёте фармакокинетических параметров, которые,

в свою очередь, не будут отражать реального поведения перхлозона в организме человека. В дальнейшем это приведёт к выбору неадекватного режима дозирования препарата, может повлечь либо недостаточную терапевтическую эффективность препарата, либо, напротив, может повысить риск нежелательных лекарственных явлений в особенности при длительной терапии с использованием «Перхлозона».

Была показана селективность методики. ПКО был рассчитан как наименьшая концентрация определяемого вещества с соотношением сигнал-шум равным 10. Для масс-спектрометрического детектирования эта величина оказалась равной 10 нг/мл при объёме ввода пробы 20 мкл, а для спектрофотометрического 250 нг/мл при том же объёме вводимой пробы. Авторы статьи утверждают, что наблюдаемая разница в чувствительности методов более чем на порядок не сказывается на возможности определения перхлозона в плазме в течение 24 часов после однократного приёма препарата, однако возможность применения метода УФ-спектрофотометрии для определения концентрации перхлозона в течение более длительных промежутков времени не изучена.

Далее в ходе валидации была оценена «воспроизводимость» на уровнях одного дня и недели. Измерения велись только с помощью масс-спектрометрического детектора и не включали оценку данной характеристики при концентрации, равной ПКО. Более целесообразно было бы проведение исследование правильности и прецизионности на уровнях одного дня и нескольких дней с расчётом относительной ошибки и относительного стандартного отклонения, соответственно. В соответствии с рекомендациями ЕМА [59] также следует оценивать правильность и прецизионность на уровне ПКО. Для полной валидации методики желательно определения всех указанных выше характеристик также и при спектрофотометрическом детектировании.

В статье нет указаний на исследование стабильности в ходе валидации, хотя эта характеристика является обязательной при валидации методики определения фармакокинетических параметров оригинального лекарственного средства.

В ходе исследования фармакокинетики в работе определены лишь основные фармакокинетические параметры: значения площади под кривыми "концентрация-время" (AUC), максимальная концентрация в плазме (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (t_{max}), период полувыведения ($T_{1/2}$). Не определены другие важные параметры фармакокинетики, время удерживания вещества в плазме (MRT), показатель скорости всасывания (C_{max}/AUC), константа элиминации (k_{el}).

Описанная в статье Власова и др. методика может быть применена для определения перхлорона в плазме крови при монотерапии туберкулёза, однако для лечения данного заболевания характерна полихимиотерапия. В этой связи необходима дальнейшая разработка методики с увеличением селективности и чувствительности при СФ-детектировании. Сканирование на масс-спектрометре в режиме индивидуальных масс (SIM) создаёт риск наложения пиков с одинаковыми молекулярными массами и невозможности их дифференцирования [46].

1.5.3 Выбор аналитической методики для определения перхлорона в плазме крови

Как уже отмечалось выше, самыми современными и распространёнными аналитическими методами в анализе фармакокинетики являются ВЭЖХ и СВЭЖХ. Перхлорон по структуре является достаточно гидрофильным соединением, что необходимо учитывать при разработке хроматографической методики. Гидрофильные соединения хуже удерживаются неподвижной фазой при работе в обращено-фазовом режиме,

и распространенным приемом для повышения удерживания таких веществ является использование режима ион-парной хроматографии [40, 41, 76-84].

Добавление к подвижной фазе ион-парного реагента позволяет увеличить фактор и время удерживания определяемого вещества. Механизм данного явления связан с образованием ионной пары между исследуемым соединением и ион-парным реагентом, при этом ионная пара значительно лучше удерживается неподвижной фазой. Также происходит сорбция ион-парного реагента на поверхности неподвижной фазы, возникает явление, подобное ионному обмену, что приводит к увеличению фактора удерживания [74, 81, 82].

Перхлорон является солью органического основания, следовательно, в качестве противоионов (ион-парных реагентов) целесообразно добавлять в подвижную фазу анионные поверхностно-активные вещества, например, соли алифатических сульфокислот (додецил-, гептил-, и гексилсульфаты) [75-77]. Концентрация ион-парного реагента не должна превышать его критической концентрации мицеллообразования (ККМ), которая индивидуальна для каждого поверхностно активного вещества и может быть установлена экспериментально, однако обычно в ион-парной хроматографии его концентрация столь низка (5-10 мМ), что находится ниже ККМ [74].

Помимо концентрации ион-парного реагента на разделение компонентов смеси значительное влияние оказывает рН подвижной фазы.

Ион-парный режим хроматографирования накладывает некоторые ограничения: разделение может проводиться только в изократическом режиме, затруднено использование масс-спектрометрического детектирования [74]. Последнее ограничение можно преодолеть, выбирая летучие ион-парные реагенты (перфторкарбоновые кислоты, моно-, ди- и триалкиламины в виде ацетатов и формиатов), которые будут удаляться в процессе электрораспыления и не создавать фона на получаемых масс-спектрах [82].

1.5.3 Выбор метода пробоподготовки при определении перхлорона в плазме крови

В качестве пробоподготовки при проведении исследований методом ВЭЖХ или СВЭЖХ обычно применяют следующие способы: жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), твердофазная экстракция (ТФЭ), осаждение белков [26].

В качестве экстрагента в ЖЖЭ чаще всего используют органические растворители (этилацетат, диэтиловый эфир, гексан, гептан, дихлорметан, хлороформ, толуол) и смеси растворителей. Селективность экстракции зависит от различия коэффициентов распределения определяемого вещества и компонентов матрицы. На полноту экстракции определяемого вещества большое влияние оказывает значение pH. ЖЖЭ может производиться при создании щелочной [33, 42, 85, 86], кислой реакции среды [34, 35, 47, 85,86], либо без специального создания pH [36, 37, 43, 44, 48, 49, 89-93]. После проведения процедуры экстракции производится удаление экстрагента при нагревании под током азота или производится упаривание под вакуумом. Далее следует процедура перерастворения сухого остатка в подходящем растворителе. Полученный раствор может быть введен в хроматограф [35, 36, 47,86-91], предварительно профильтрован [92] или подвергнут центрифугированию [34, 42, 44, 48, 85].

ТФЭ, как способ пробоподготовки, позволяет получать высокоочищенные пробы, содержащие малое количество посторонних веществ. Процедура ТФЭ предполагает нанесение пробы на картридж с сорбентом, последовательное пропускание через картридж различных растворителей, которые элюируют посторонние вещества, далее пропускают растворитель, элюирующий исследуемые вещества, и производят упаривание элюата с последующим перерастворением сухого остатка [38, 39, 94-98]. В тех случаях, когда количество элюирующего растворителя невелико, или,

когда не требуется концентрирование получившегося раствора, упаривание не производят [40, 99].

Наиболее распространенными стационарными фазами в ТФЭ до недавнего времени были ОФ (обращённые фазы) С18 и С8. Сейчас стали использовать полимерные сорбенты, лишенные недостатков, характерных для обращенно-фазных сорбентов, синтезируемых на основе силикагеля. Полимерные сорбенты пригодны для работы в широком диапазоне значений рН; обладают более высокой емкостью по отношению к полярным веществам, не требуют кондиционирования перед нанесением пробы [105]. Для извлечения полярных аналитов используются также комбинированные сорбенты, например, BondElut Certify [106], BondElut Certify II [107], которые представляют собой комбинацию ОФ С8 и ионообменников. Можно предположить, что ТФЭ с использованием комбинированных сорбентов будет эффективна в случае извлечения перхлорона из плазмы крови.

По трудоемкости ТФЭ сопоставима с ЖЖЭ, а часто сопровождается большим количеством этапов пробоподготовки, чем ЖЖЭ. Для обоих методов существует возможность автоматизации процесса пробоподготовки [108, 109].

Самым быстрым способом пробоподготовки плазмы для анализа методом ВЭЖХ или методом СВЭЖХ является осаждение белков. Данный способ пробоподготовки весьма быстр и прост и имеет меньшую по сравнению с ТФЭ и ЖЖЭ стоимость. Осаждение белков может быть достигнуто созданием значений рН, при которых происходит коагуляция белка, например, к пробе добавляют кислоты (трифторуксусную, трихлоруксусную, перхлоруксусную) [45, 50]; к пробе плазмы могут быть добавлены смешивающиеся с водой органические растворители – метанол [100, 101], этанол, ацетонитрил [41, 102, 103], или соли металлов: цинка, свинца и др. Осаждение белков позволяет в некоторых случаях удалить до 98 % белков [104]. При выборе осаждающего реактива необходимо учитывать

возможные реакции с определяемым ЛВ – гидролиз, комплексообразование и нерастворимость ЛВ в получившихся условиях. Следует учитывать процесс разбавления пробы, что может привести к недостаточной чувствительности или к увеличению объема вводимой в хроматограф пробы. Ввод в хроматографическую колонку сильноокислой пробы или пробы с существенно большим содержанием ацетонитрила или метанола, чем в ПФ, может сопровождаться изменением хроматографических параметров системы – миграцией времен удерживания компонентов, снижением числа теоретических тарелок, симметрии пиков и других параметров пригодности.

После осаждения белков супернатант отделяют центрифугированием, после чего пробы вводятся в хроматограф. В редких случаях пробы могут потребовать повторного центрифугирования или фильтрации. Необходимо отметить, что при использовании различных осаждающих реактивов достигается разная эффективность осаждения белков из плазмы [104], поэтому в пробе могут оставаться белки.

Для выделения из плазмы крови перхлорона, являющегося солью слабого органического основания, можно предложить осаждение белков с помощью сильных органических кислот (трифторуксусная, трихлоруксусная), которые способны образовать с перхлороном хорошо растворимые соли.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. На основании обзора существующих методик пробоподготовки и анализа образцов плазмы крови человека при проведении биоаналитических исследований, а также на основании информации о химических свойствах перхлозона сделаны предположения о вероятных оптимальных условиях анализа: метод ВЭЖХ с УФ детектированием, добавление ион-парного реагента в подвижную фазу, применение осаждения белков плазмы трифторуксусной кислотой.
2. По результатам сравнительного обзора требований руководств по валидации биоаналитических методик FDA, EMA выбраны основные валидационные параметры, изучение которых необходимо при разработке методики определения инновационного препарата «Перхлозон» в плазме крови, а именно: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного обнаружения, стабильность
3. Выбраны основные фармакокинетические параметры (значения площади под кривыми "концентрация-время" (AUC), максимальная концентрация в плазме (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (t_{max}), период полувыведения ($T_{1/2}$), время удерживания вещества в плазме (MRT)), изучение которых необходимо в ходе проведения клинического исследования инновационного противотуберкулёзного лекарственного препарата «Перхлозон».

ГЛАВА 2 РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРХЛОРОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Оборудование

- Жидкостной хроматограф WatersAlliance 2695 с диодноматричным детектором 2998, Сингапур;
- весы лабораторные Mettler Toledo, AL 204, Швейцария;
- анализатор жидкости FiveTMFE-20 (pH-метр) MettlerToledo, Швейцария;
- дозатор переменного объема Ленпипет Дигитал 100 – 1000 мкл, Россия;
- дозатор переменного объема Ленпипет Дигитал 10 – 100 мкл, Россия;
- центрифуга Thermo Scientific, SL16, Германия;
- вортекс-шейкер Heidolph, Reax top;
- холодильник Indesit, SD 125;
- морозильник для плазмы Pozis, MM-180/20/35;
- система водоподготовки Millipore, Milli-QAdvantageA10, Франция;
- микроцентрифужные пробирки Eppendorf вместимостью 2 мл;
- колбы мерные класса «А» вместимостью 50 и 100 мл.
- Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке.

2.1.2 Реактивы

- ацетонитрил Super Gradient, Lab-Scan Analytical Sciences;
- калия дигидрофосфат (х.ч.);
- фосфорная кислота (х.ч.);
- трифторуксусная кислота (х.ч.);

- вода очищенная;
- вода Milli-Q.

2.1.3 Стандартный образец

- Перхлорон, субстанция порошок (ОАО «Фармасинтез», Россия, содержание перхлорона 99,7 %)

2.1.4 Приготовление растворов и пробоподготовка

Образцы интактной («чистой») и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы крови (Pozis, MM-180/20/35, Россия) при температуре от -35°C до -40°C . Стандартные растворы хранили в фармацевтическом холодильнике при температуре от 2°C до 8°C (Pozis, ХФ-250, Россия). Чистая плазма достоверно не содержала исследуемого вещества и была предоставлена Отделом внедрения новых лекарственных средств Научно-исследовательского Института Фармации.

Исходный стандартный раствор перхлорона готовили растворением навески в метаноле и хранили при температуре от -35°C до -40°C . Рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходного стандартного раствора перхлорона водой Milli-Q (Millipore, Milli-Q Advantage A10, Франция).

Первоначально была предпринята попытка воспроизвести подходы, описанные в статье А.М. Власова и др. [63], однако не удалось получить удовлетворительных результатов. В связи с этим на основании описанных в предыдущей главе общих подходов к разработке биоаналитических методик были экспериментально подобраны оптимальные условия анализа, которые будут описаны далее.

В качестве способа пробоподготовки было выбрано осаждение белков плазмы с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ). 150 мкл исследуемой плазмы (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором перхлорона) вносили в центрифужные пробирки Eppendorf вместимостью 1,5 мл, прибавляли 50 мкл 50 % раствора ТФУ, перемешивали на вортекс-шейкере

в течение 1 мин, центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 минут, после чего переносили 125 мкл надосадочной жидкости в микровиалы для ВЭЖХ.

2.1.5 Условия хроматографирования

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе WatersAlliance 2695 с диодноматричным детектором 2998. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения WatersEmpower 2.

Подвижная фаза: ацетонитрил - 50 mM фосфатный буфер с 5 mM октансульфонатом натрия pH 2,50, 15% : 85% по объёму, предварительно профильтрованная и дегазированная.

Скорость потока подвижной фазы: 1 мл/мин.

Неподвижная фаза: хроматографическая колонка WatersAtlantisT3 5u, 150x4.6 мм, 5 мкм, предколонка WatersAtlantisT3 5 мкм 4.6*20 мм, при температуре 25 °С.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Время хроматографирования: 8 мин.

Детектирование: диодноматричный детектор при длине волны $347 \pm 1,2$ нм с записью спектра в диапазоне 220 – 400 нм.

Время удерживания: перхлорона – около 6,2 мин.

2.2 Результаты и их обсуждение

Условия анализа подобраны экспериментально. Осаждение белков плазмы ТФУ является удобным и быстрым способом пробоподготовки, причём, т.к. перхлорон является слабым основанием, он не соосаждается с белками, а остаётся в надосадочной жидкости в виде соли.

Как следствие, перхлорон в форме катиона слабо удерживался неполярной неподвижной фазой, но в присутствии ион-парного реагента

(октансульфонат натрия) удалось улучшить удерживание исследуемого вещества на колонке и достичь оптимального хроматографического разделения.

2.2.1 Валидация методики

Валидацию методики определения перхлорона в плазме крови человека проводили на основании руководств по валидации биоаналитических методик FDA[58] и ЕМА [59] по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность (на уровне *intra-day* – внутри цикла и *inter-day* – между циклами), предел количественного определения.

2.2.1.1 Селективность

Для определения селективности проводили анализ 6 образцов чистой плазмы и образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентрации 1 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания перхлорона. Хроматограммы чистой плазмы и чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентрации 1 мкг/мл приведены на Рисунках 2-3.

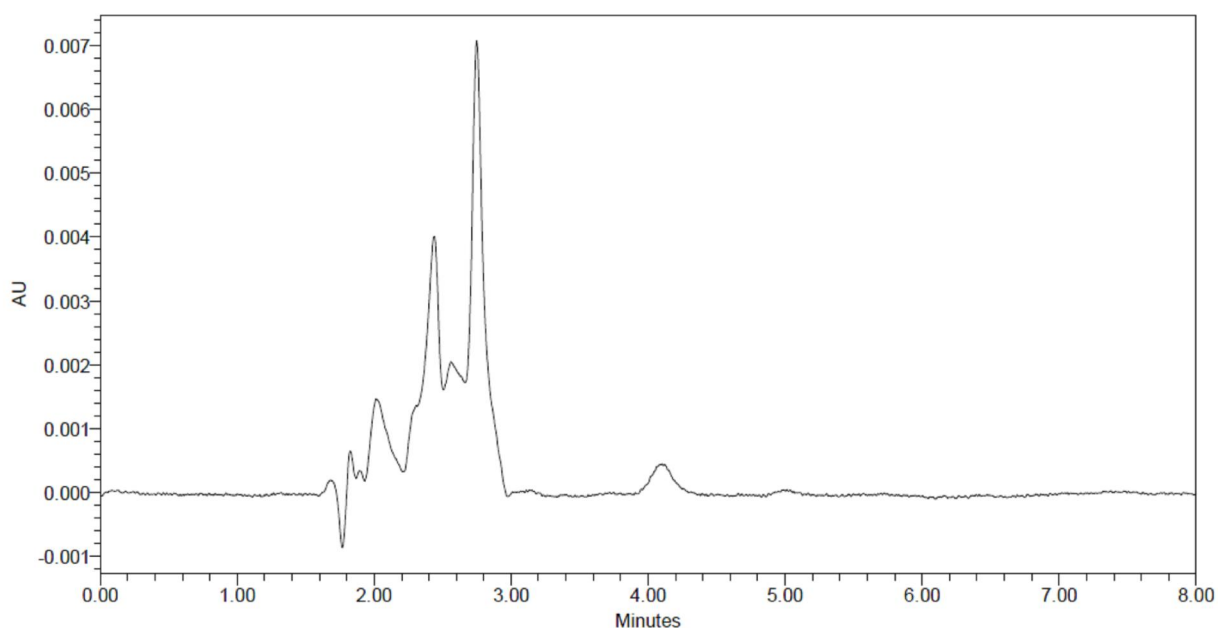


Рисунок 2. Хроматограмма чистой плазмы.

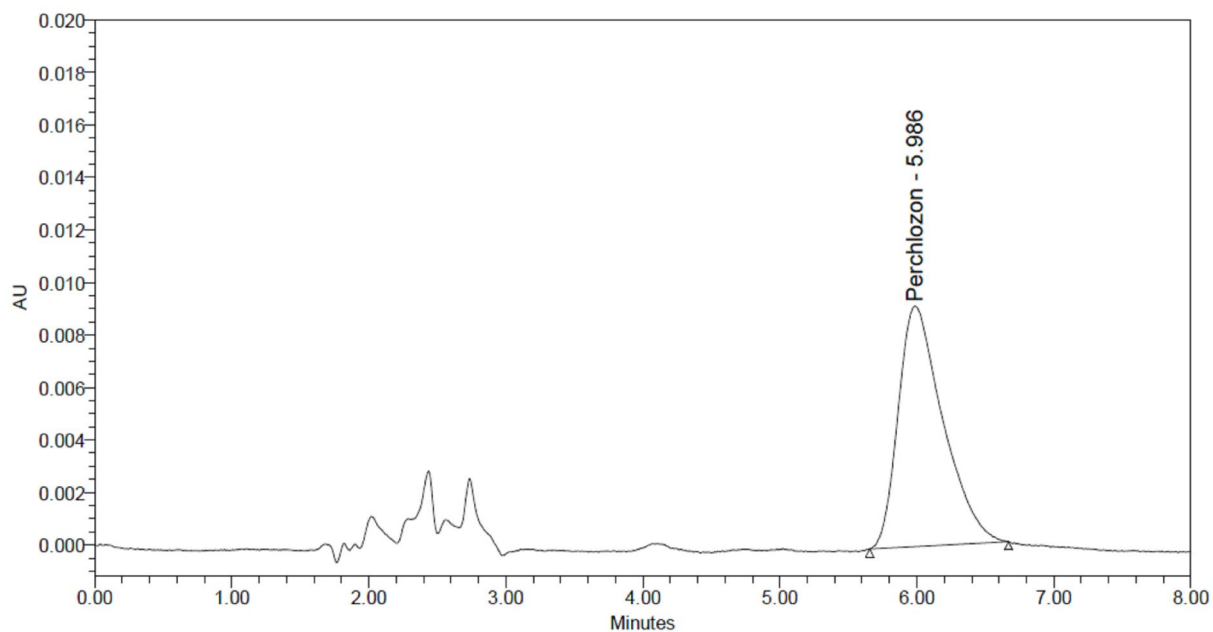


Рисунок 3. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентрации 1 мкг/мл.

Эффективность хроматографической колонки по пику перхлорона составила 9166 теоретических тарелок, фактор асимметрии составил 1,25.

2.2.1.2 Линейность

Проводили анализ 5 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентраций: 200 нг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ($r^2 > 0,998$), приведенный на Рисунке 4, и рассчитано уравнение калибровочной кривой ($Y = 2,44 \cdot 10^5 X - 1,68 \cdot 10^4$).

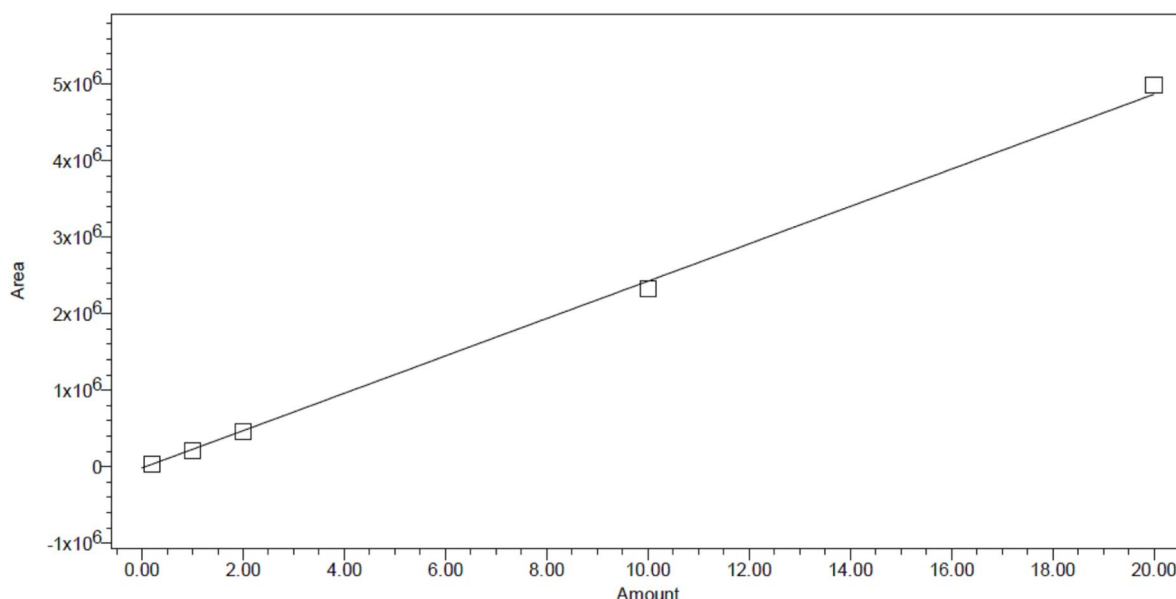


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

C факт, МКГ/МЛ	0,20	1,00	2,00	10,00	20,00
C рассчит, МКГ/МЛ	0,23	0,92	1,94	9,62	20,51
ε, %	12,73	-8,28	-3,12	-3,85	2,53
Норма, не более	20 %	15%			

Полученные отклонения соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек).

2.2.1.3 Правильность и прецизионность

Для оценки прецизионности и правильности методики проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентраций: 200 нг/мл, 2 мкг/мл, 20 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в Таблице 2.

Таблица 2

Оценка правильности и прецизионности методики

введено (мкг/мл)	найдено (нг/мл)	найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	ϵ, %
0,2	0,16	0,19	0,02	11,87	-3,00
	0,19				
	0,19				
	0,21				
	0,22				
2	1,95	2,05	0,17	8,13	2,70
	2,31				
	1,87				
	2,05				
	2,09				
20	19,4	20,30	1,18	5,80	1,50
	19,6				
	19,5				
	22,1				
	20,9				

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) соответствуют нормам FDA и EMA

(не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных двух концентраций).

2.2.1.4 Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. Предел количественного определения методики составил 200 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 5.

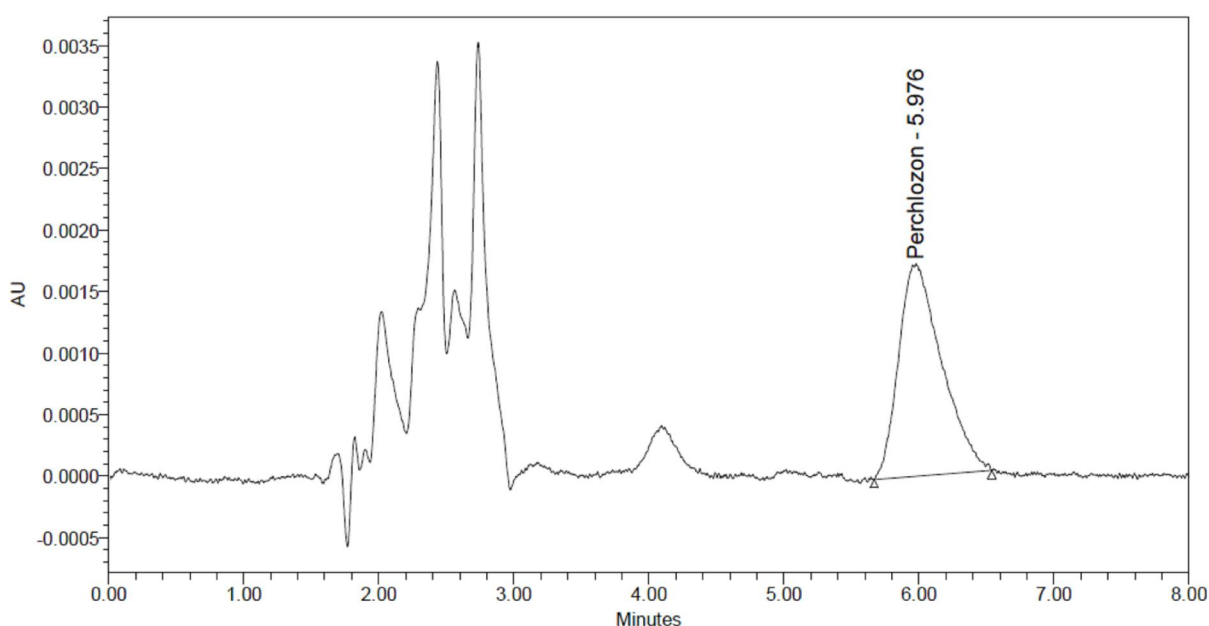


Рисунок 5. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона на уровне ПКО.

2.2.1.5 Стабильность

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов перхлорона (при хранении раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день), долговременная (при хранении в течение 1 мес в морозильнике для плазмы крови при температуре от –35 °С до –40 °С) на уровнях концентраций 200 нг/мл и 20 мкг/мл. Образцы выдерживали 3

цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Разработана методика количественного определения перхлозана в плазме крови человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. В ходе валидации продемонстрировано, что методика является селективной, точной, прецизионной и линейной, соответствует требованиям руководств FDA [58] и ЕМА [59] по валидации биоаналитических методик.

ГЛАВА 3 ПЕРЕНOS МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРХЛОЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Аналитическая часть исследования эффективности и безопасности перхлозона при комплексной терапии туберкулёза проводилась на оборудовании, отличном от того, которое было описано выше и использовалось в клиническом исследовании первой фазы. Согласно требованиям руководств по валидации, при переносе методики потребовалось проведение частичной валидации методики по показателям: селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения.

Для переноса ВЭЖХ методики были выбраны две хроматографические системы: исходная хроматографическая система – хроматограф WatersAlliance 2695 с автосамплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором Waters 2998 (Waters, США) под управлением программного обеспечения WatersEmpowerPro 2. Подробно оборудование, условия и результаты анализа описаны в предыдущей главе.

Система для переноса методики: хроматограф Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), оснащенный градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, диодноматричным УФ-

детектором G1315D. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation (ver. B.03.01). Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 150x4,6 мм, 5 мкм с предколонкой Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5*4,6мм 5 мкм.

В данной работе продемонстрирован перенос разработанной методики определения перхлорона в крови методом ион-парной ВЭЖХ с УФ детектированием.

3.1 Материалы и методы

3.1.1 Оборудование

- Жидкостной хроматограф Agilent 1200 Series с диодноматричным детектором, США;
- весы лабораторные Mettler Toledo, AL 204, Швейцария;
- анализатор жидкости FiveTM FE-20 (рН-метр) Mettler Toledo, Швейцария;
- дозатор переменного объема Ленпипет Дигитал 100 – 1000 мкл, Россия;
- дозатор переменного объема Ленпипет Дигитал 10 – 100 мкл, Россия;
- центрифуга Thermo Scientific, SL16, Германия;
- центрифуга Eppendorf Minispin, Германия;
- вортекс-шейкер Heidolph, Reax top;
- холодильник Indesit, SD 125;
- морозильник для плазмы Pozis, MM-180/20/35;
- система водоподготовки Millipore, Milli-Q Advantage A10, Франция.

3.1.2. Реактивы

- ацетонитрил Super Gradient, Lab-Scan Analytical Sciences (Panreac, Испания);

- калия дигидрофосфат (х.ч., Panreac, Испания);
- фосфорная кислота (х.ч., Panreac, Испания);
- трифторуксусная кислота (х.ч., Panreac, Испания);
- октансульфонат натрия (ч.д.а., Panreac, Испания);
- вода очищенная;
- вода Milli-Q.

3.1.3. Стандартный образец

- перхлорзон, субстанция-порошок (ОАО «Фармасинтез», Россия, содержание перхлорзона 99,7 %).

3.1.4. Методика пробоподготовки

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре от – 35 °С до – 40 °С. Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре от +2 до +8 °С.

В качестве способа пробоподготовки было выбрано осаждение белков плазмы с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ). 150 мкл чистой плазмы крови (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором перхлорзона) вносили в центрифужные пробирки Eppendorf вместимостью 2 мл, прибавляли 50 мкл 50 % раствора трифторуксусной кислоты, встряхивали на вортекс-шейкере при 2400 об/мин в течение 20 секунд, и центрифугировали при 15200 об/мин в течение 10 мин. Отбирали 125 мкл надосадочной жидкости и переносили в микровиалы для ВЭЖХ.

3.1.5. Условия хроматографирования

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series с диодноматричным детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation.

Подвижная фаза: ацетонитрил - 50 мМ фосфатный буфер с 5 мМ октансульфонатом натрия рН 2,50, 15 : 85 по объёму, предварительно профильтрованная и дегазированная.

Скорость потока подвижной фазы: 1 мл/мин.

Неподвижная фаза: хроматографическая колонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 150x4,6 мм, 5 мкм с предколонкой Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5*4,6мм 5 мкм при температуре 25 °С.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Время хроматографирования: 8 мин.

Детектирование: диодноматричный детектор при длине волны $347 \pm 1,2$ нм с записью спектра в диапазоне 190 – 400 нм.

Время удерживания: перхлорона – около $5,2 \pm 0,2$ мин.

3.2 Результаты и их обсуждение

Разработанная методика определения перхлорона методом ион-парной ВЭЖХ с УФ детектированием была перенесена с системы Waters Alliance на систему Agilent 1260 HPLC без изменения состава подвижной фазы, скорости потока, объема вводимой пробы и условий детектирования. При этом была произведена замена хроматографической колонки Waters Atlantis Т3 на колонку Agilent Zorbax Eclipse Plus C18.

3.2.1 Валидация методики

Валидацию методики при ее переносе определения перхлорона в плазме крови проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [58] и ЕМА [59], по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения. Следует отметить, что согласно нормативным документам FDA и ЕМА при переносе биоаналитической методики на новую хроматографическую станцию или в другую лабораторию проводится

частичная валидация методики (по основным валидационным характеристикам – селективность, линейность, правильность, прецизионность).

3.2.1.1 Селективность

Для определения селективности хроматографических систем проводили анализ 6 образцов чистой плазмы и образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентрации 1 мкг/мл. На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания перхлорона.

3.2.1.2 Линейность

Для определения линейности на каждой хроматографической системе проводили анализ 5 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентраций: 200 нг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики. Калибровочный график для системы Waters ($r^2 > 0,998$), приведен на Рисунке 6. Калибровочный график для системы Agilent ($r^2 > 0,99913$), приведен на Рисунке 7.

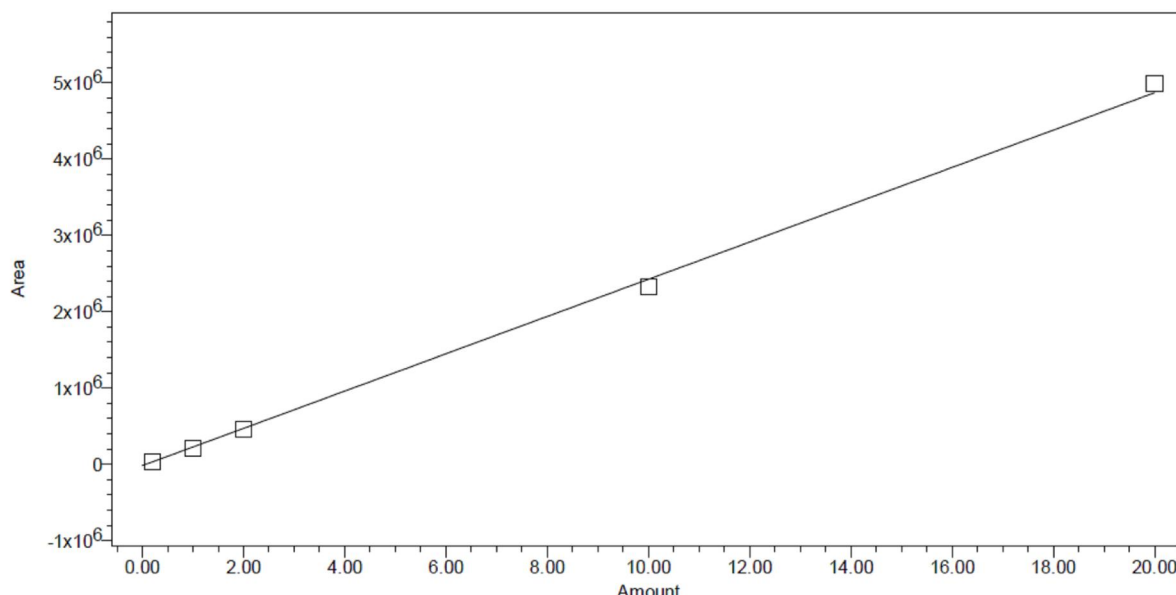


Рисунок 6. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме; система Waters.

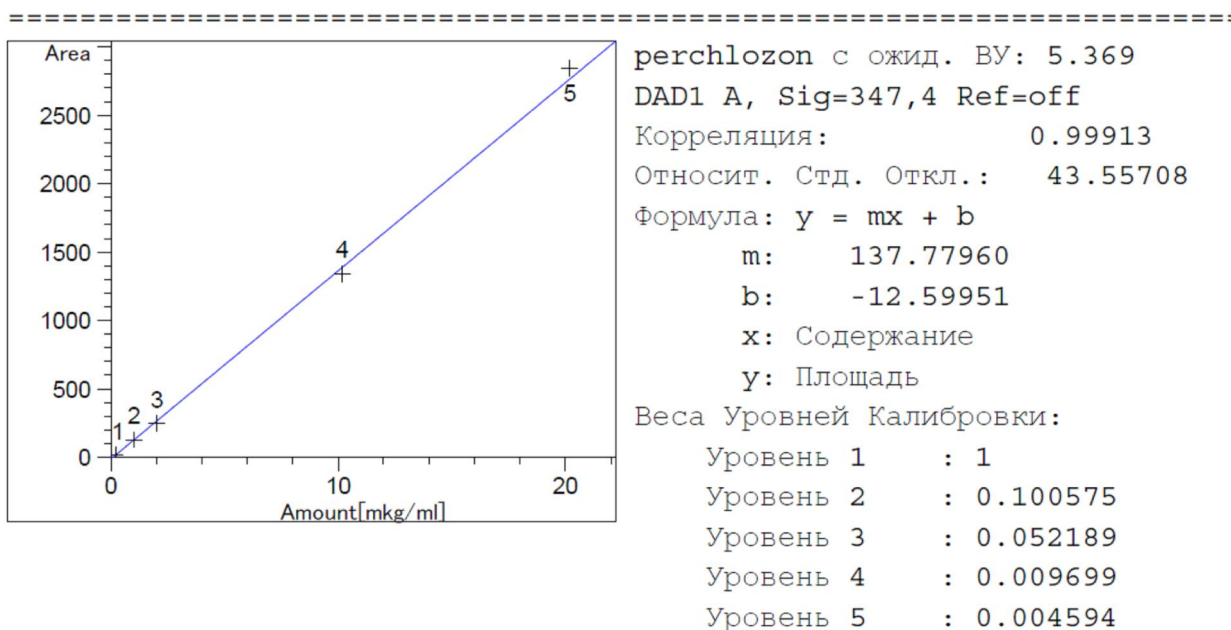


Рисунок 7. Калибровочный график зависимости площади пика перхлорона от его концентрации в плазме; система Agilent.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в Таблице 3.

Таблица 3

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

Система Waters Alliance					
$C_{\text{факт}}$, МКГ/МЛ	0,2	1	2	10	20
$C_{\text{рассчит}}$, МКГ/МЛ	0,23	0,92	1,94	9,62	20,51
ε , %	12,73	-8,28	-3,12	-3,85	2,53
Норма, не более	20 %	15%			
Система Agilent HPLC 1260					
$C_{\text{факт}}$, МКГ/МЛ	0,2	1	2	10	20
$C_{\text{рассчит}}$, МКГ/МЛ	0,18	1,03	1,91	9,86	20,72
ε , %	-10	3	-4,5	-1,4	3,6
Норма, не более	20 %	15%			

Полученные отклонения соответствуют нормам FDA [58] и ЕМА [59] (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % - для остальных точек).

3.2.1.3 Правильность и прецизионность

Для оценки прецизионности и правильности методик проводили анализ 3 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона до получения концентраций: 200 нг/мл, 2 мкг/мл, 20 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 5 раз. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε , %), приведенные в Таблице 4.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε , %) соответствуют нормам FDA[58] и ЕМА [59](не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных двух концентраций).

Таблица 4

Оценка правильности и прецизионности методики

Система Waters Alliance					
введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
0,2	0,16	0,19	0,02	11,87	- 3,00
	0,19				
	0,19				
	0,21				
	0,22				
2	1,95	2,05	0,17	8,13	2,70
	2,31				
	1,87				
	2,05				
	2,09				
20	19,4	20,30	1,18	5,80	1,50
	19,6				
	19,5				
	22,1				
	20,9				
Система Agilent HPLC 1260					
введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
0,2	0,18	0,194	0,01	5,88	- 3,00
	0,19				
	0,21				
	0,20				
	0,19				
2	1,91	1,976	0,11	5,42	- 1,20
	1,95				
	2,11				
	2,06				
	1,85				
20	20,72	20,520	0,79	3,83	2,60
	21,14				
	21,35				
	19,67				
	19,72				

3.2.1.4 Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методик был установлен на основании данных линейности, правильности и прецизионности. ПКО методик составил 200 нг/мл. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики определения перхлорона в системе Agilent 1260, приведена на Рисунке 8.

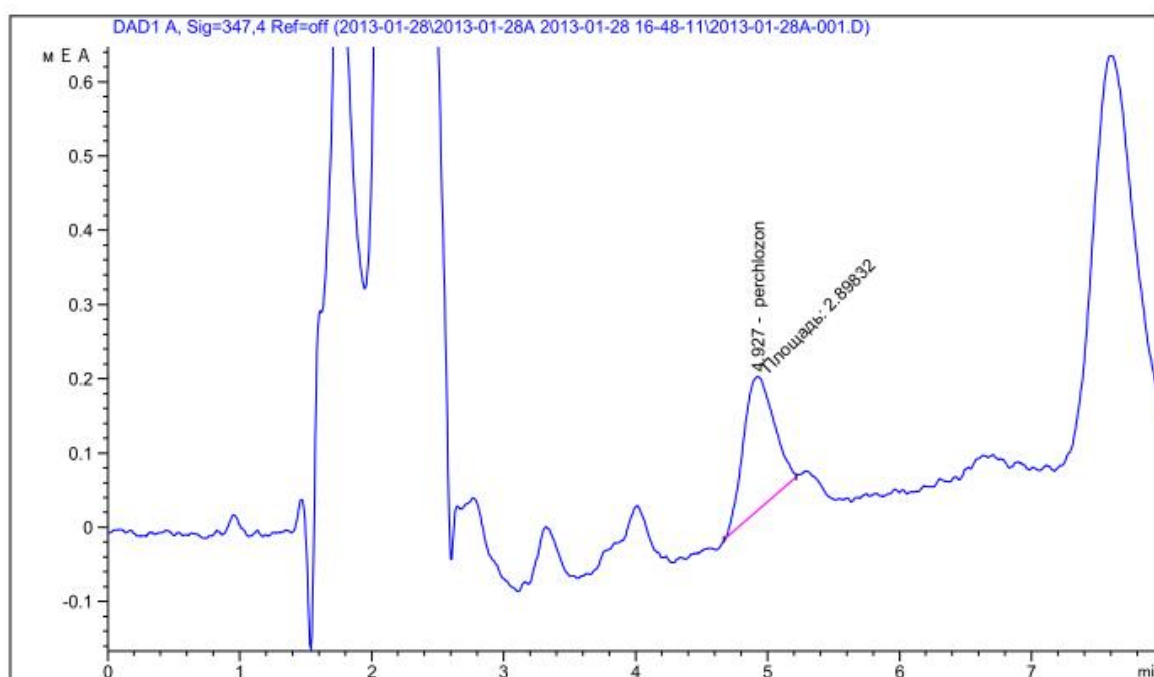


Рисунок 8. Хроматограмма чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора перхлорона на уровне ПКО.

Был произведен успешный перенос методики определения перхлорона методом ион-парной ВЭЖХ с УФ – детектированием. При переносе была произведена валидация методики по показателям: селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения. Показано, что разработанная методика может быть быстро перенесена на другую хроматографическую систему, при сохранении условий ВЭЖХ разделения.

ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ОРИГИНАЛЬНОГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНОГО ПРЕПАРАТА «ПЕРХЛОЗОН»

4.1 Дизайн исследования

Разработанная методика была успешно применена в открытом исследовании I фазы по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости препарата «Перхлозон» (капсулы 400 мг) у здоровых добровольцев при однократном введении (протокол № PERHL-11-2011), а также к открытому сравнительному рандомизированному многоцентровому исследованию эффективности и безопасности препарата «Перхлозон» в комплексной терапии больных туберкулезом легких (протокол П02/10). Оба исследования были одобрены Министерством Здравоохранения России и локальными этическими комитетами в установленном порядке. Среди задач первого исследования было исследовать фармакокинетику перхлозона при однократном применении различных доз. Среди задач второго исследования было определить равновесную (стационарную) концентрацию на фоне курсового применения различных доз (800 мг/сутки, 1200 мг/сутки или в дозе 1600 мг/сутки) препарата «Перхлозон».

Таким образом, в первом исследовании перхлозон определялся в плазме крови добровольцев, во втором исследовании – в плазме крови пациентов на фоне сопутствующей терапии (I-й режим химиотерапии - Изониазид, Пиразинамид, Рифампицин; IV-й режим химиотерапии - Пиразинамид, Канамицин/Амикацин или Капреомицин, Протионамид/Этионамид, Этамбутол, Циклосерин и ПАСК в соответствии с приказом МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г.)

4.2 Результаты и их обсуждение

Индивидуальные профили изменения концентраций (C) перхлозона в плазме крови во времени (t), зарегистрированные после приема препарата «Перхлозон», капсулы 400 мг, 800 мг, 1200 мг, характеризовали максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max} , наибольшее из измеренных значений), временем ее достижения (T_{max}), также площадью под кривой «концентрация – время» в пределах от нуля до момента отбора последней пробы крови ($t = 72$ ч), рассчитанной методом трапеций (AUC_{0-72}), периодом полувыведения ($t_{1/2}$), средним временем удерживания (MRT), константой элиминации (k_{el}), показателем скорости всасывания (C_{max}/AUC). Сопоставление значений AUC_{0-72} с общим $AUC_{0-\infty}$ (их отношение составляло значительно больше 80%) свидетельствовало о том, что выбранный регламент фармакокинетического исследования обеспечивает необходимую надежность оценки фармакокинетических параметров перхлозона.

Индивидуальные уровни концентраций перхлозона и описательная статистика полученных данных приведены в Таблицах 5 – 8. Индивидуальные фармакокинетические параметры представлены в Таблицах 9 – 12.

При определении перхлозона в плазме крови пациентов на фоне сопутствующей противотуберкулёзной терапии было показано, что не наблюдается наложения пика перхлозона на пики, соответствующие другим противотуберкулёзным препаратам (Рисунок 9).

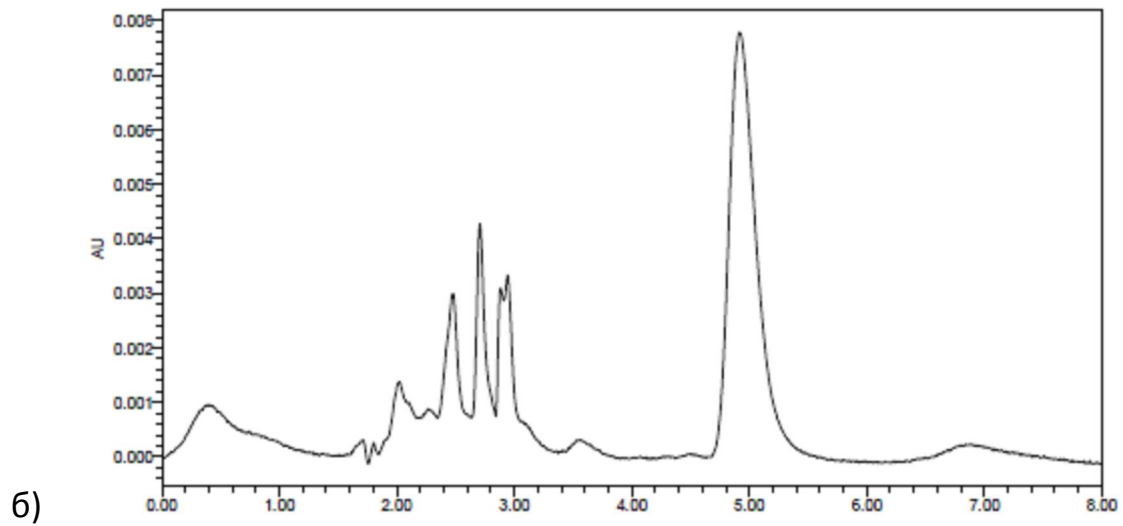
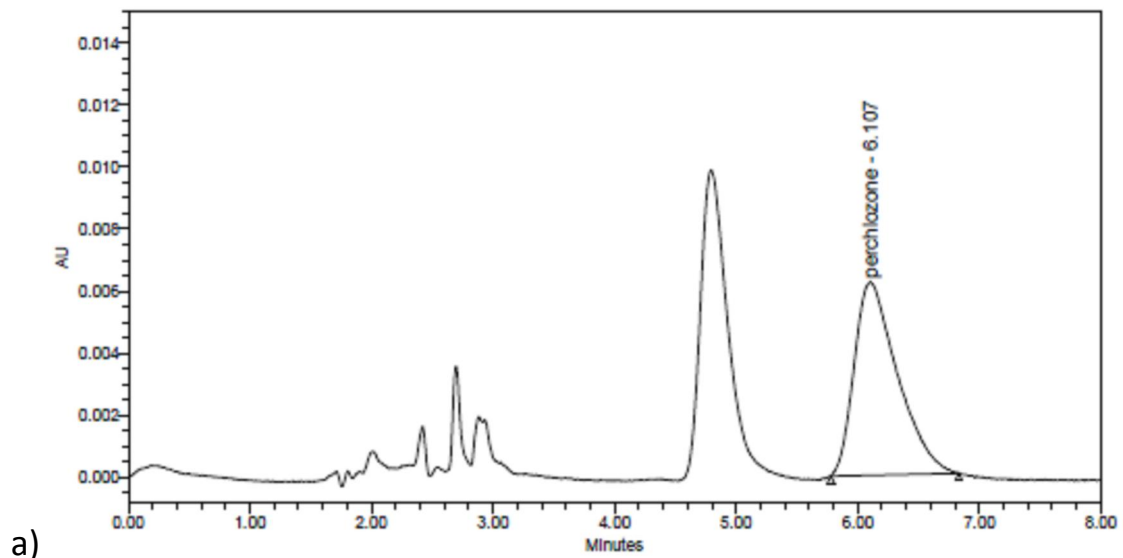


Рисунок 9. Хроматограмма плазмы крови пациента во время курсового приема препарата Перхлозон на фоне сопутствующей терапии (а) и при применении тех же противотуберкулёзных препаратов за исключением перхлозона (б) (WatersAlliance 2965).

Таблица 5

Индивидуальные уровни концентраций перхлорона после приема препарата в дозировке 400 мг

№ добр.	Время после приема препарата, час													
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	8	12	24	48	72
1*	0	2,63	2,90	3,11	5,02	5,39	4,93	4,43	4,36	2,64	2,01	0,87	0,26	0,00
2	0	3,93	3,81	2,69	3,19	2,73	2,37	2,26	2,02	1,59	1,08	0,29	0,00	0,00
3	0	4,13	5,15	3,61	3,66	2,92	2,54	2,56	1,72	1,42	0,79	0,26	0,00	0,00
4	0	5,60	4,93	4,76	4,96	4,41	3,51	3,21	3,11	2,65	1,10	0,54	0,00	0,00
5	0	0,56	1,21	4,27	8,72	7,88	6,75	6,39	1,56	4,36	0,73	1,70	0,56	0,00
6	0	2,11	3,01	2,77	2,54	2,41	2,33	2,17	2,06	1,70	1,44	0,55	0,00	0,00
7	0	3,61	3,73	3,61	3,42	3,35	3,29	3,15	2,79	1,99	2,01	0,84	0,00	0,00
8	0	0,49	3,57	3,85	3,82	3,60	2,89	3,07	2,93	2,54	1,58	0,23	0,00	0,00
9	0	0,63	1,31	2,43	1,13	1,44	0,99	1,04	1,16	1,18	1,69	0,32	0,00	0,00
10	0	3,08	2,83	2,20	2,45	2,12	1,89	1,73	1,56	1,33	0,84	0,40	0,00	0,00
Ср. знач	0	2,68	3,24	3,33	3,89	3,63	3,15	3,00	2,33	2,14	1,33	0,60	0,08	0,00
Ср. геом	0	1,99	2,95	3,24	3,44	3,25	2,80	2,69	2,16	1,98	1,24	0,49	---	---
SD	0	1,73	1,31	0,83	2,06	1,88	1,64	1,51	0,97	0,96	0,49	0,45	0,19	0,00
CV, %	0	64,76	40,28	24,94	52,84	51,79	52,12	50,30	41,52	44,65	36,72	74,71	227,77	---
Median	0	2,85	3,29	3,36	3,54	3,13	2,72	2,82	2,04	1,85	1,27	0,47	0,00	0,00
Дов.инт.	0	0,90	0,68	0,43	1,07	0,98	0,85	0,78	0,50	0,50	0,25	0,23	0,10	---
L-90 %	0	1,77	2,56	2,90	2,82	2,65	2,30	2,22	1,82	1,64	1,07	0,37	0,00	---
U - 90 %	0	3,58	3,92	3,76	4,96	4,60	4,00	3,79	2,83	2,64	1,58	0,83	0,18	---

* проба 2,5 ч: 5,16 мкг/мл

0,00 – менее предела количественного определения

Таблица 6

Индивидуальные уровни концентраций перхлорона после приема препарата в дозировке 800 мг

№ добр.	Время после приема препарата, час													
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	8	12	24	48	72
1	0	0,58	7,43	8,80	8,42	7,66	7,02	6,69	6,09	4,93	3,43	1,09	0,00	0,00
2	0	0,00	9,47	8,09	7,56	7,57	6,43	6,42	5,43	4,77	2,86	0,77	0,00	0,00
3	0	0,00	2,35	5,00	8,98	6,91	6,39	5,80	3,28	4,81	3,65	1,28	0,00	0,00
4	0	8,34	9,27	8,26	7,66	6,83	6,23	5,34	5,32	4,59	2,91	1,71	0,23	0,00
5	0	7,03	6,67	6,52	6,68	5,89	5,56	4,59	4,07	3,31	2,47	0,48	0,00	0,00
6	0	3,26	4,25	4,75	4,68	4,08	3,87	3,81	3,47	3,12	2,87	1,28	0,00	0,00
7	0	2,12	4,40	4,78	4,03	3,76	3,54	3,34	2,99	2,76	2,01	1,10	0,00	0,00
8	0	4,17	6,02	5,71	5,40	4,77	4,66	4,15	3,52	3,03	2,37	0,71	0,00	0,00
9	0	2,47	5,70	5,53	5,11	4,33	4,02	3,89	3,47	2,92	3,12	1,88	0,00	0,00
10	0	3,37	5,18	5,48	4,18	3,11	3,88	3,61	3,11	2,51	2,82	0,63	0,00	0,00
Ср. знач	0	3,13	6,07	6,29	6,27	5,49	5,16	4,76	4,08	3,68	2,85	1,09	0,02	0,00
Ср. геом	0	---	5,66	6,13	6,03	5,25	5,01	4,63	3,95	3,56	2,81	1,00	---	---
SD	0	2,81	2,23	1,54	1,82	1,68	1,31	1,22	1,12	0,97	0,49	0,46	0,07	0,00
CV, %	0	89,66	36,76	24,48	29,00	30,66	25,32	25,51	27,41	26,48	17,08	42,16	316,23	---
Median	0	2,87	5,86	5,62	6,04	5,33	5,11	4,37	3,50	3,22	2,87	1,10	0,00	0,00
Дов.инт.	0	1,46	1,16	0,80	0,95	0,88	0,68	0,63	0,58	0,51	0,25	0,24	0,04	---
L-90 %	0	1,67	4,91	5,49	5,32	4,62	4,48	4,13	3,49	3,17	2,60	0,85	0,00	---
U - 90 %	0	4,60	7,24	7,09	7,22	6,37	5,84	5,40	4,66	4,18	3,10	1,33	0,06	---

0,00 – менее предела количественного определения

Таблица 7

Индивидуальные уровни концентраций перхлорона после приема препарата в дозировке 1200 мг

№ добр.	Время после приема препарата, час													
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	8	12	24	48	72
1	0	1,88	9,07	9,03	9,26	7,43	8,36	11,02	10,68	8,12	8,26	4,57	1,71	0,49
2	0	1,80	8,09	9,07	9,22	9,22	9,09	7,87	7,64	6,44	5,91	2,79	0,19	0,00
3	0	5,85	12,49	15,93	15,11	14,75	13,60	10,88	11,71	9,31	7,49	3,65	0,39	0,00
4	0	3,16	10,24	8,88	13,37	13,20	12,70	14,39	11,90	9,69	8,08	4,37	0,51	0,00
5	0	4,96	9,17	10,15	12,13	14,52	13,62	13,12	13,07	10,18	9,81	5,07	0,36	0,00
6	0	3,71	5,99	6,35	5,86	5,40	4,99	4,76	4,36	3,67	3,52	2,00	0,00	0,00
7	0	3,86	6,12	6,54	6,01	5,11	4,85	4,39	3,91	3,69	3,39	1,18	0,25	0,00
8	0	5,08	6,91	7,15	6,92	6,71	6,32	6,19	5,49	4,26	3,91	3,47	0,91	0,00
9	0	4,45	5,43	5,32	4,75	5,49	5,32	5,12	4,87	4,27	4,14	2,12	0,00	0,00
10	0	3,75	4,89	5,76	5,18	5,03	4,11	3,87	3,61	3,02	2,78	1,76	0,00	0,00
Ср. знач	0	3,85	7,84	8,42	8,78	8,69	8,30	8,16	7,72	6,27	5,73	3,10	0,43	0,05
Ср. геом	0	3,61	7,52	8,00	8,13	7,94	7,55	7,34	6,90	5,69	5,24	2,82	---	---
SD	0	1,32	2,41	3,10	3,68	4,00	3,79	3,89	3,75	2,82	2,51	1,33	0,53	0,15
CV, %	0	34,30	30,80	36,83	41,87	46,07	45,74	47,70	48,55	45,05	43,77	42,83	122,64	316,23
Median	0	3,81	7,50	8,02	8,07	7,07	7,34	7,03	6,57	5,36	5,03	3,13	0,31	0,00
Дов.инт.	0	0,69	1,26	1,61	1,91	2,08	1,97	2,02	1,95	1,47	1,30	0,69	0,28	0,08
L-90 %	0	3,16	6,58	6,81	6,87	6,60	6,32	6,14	5,77	4,80	4,42	2,41	0,16	0,00
U - 90 %	0	4,54	9,10	10,03	10,69	10,77	10,27	10,19	9,67	7,73	7,03	3,79	0,71	0,13

0,00 – менее предела количественного определения

Таблица 8

Индивидуальные уровни концентраций перхлорона после приема препарата в дозировке 1600 мг

время, ч № добр.	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	8	12	24	48	72
1	0	0,00	9,22	9,42	10,54	11,66	14,88	17,59	18,08	17,27	15,19	15,14	9,59	2,25

0,00 – менее предела количественного определения

Таблица 9

Индивидуальные фармакокинетические параметры перхлорона после приема препарата в дозировке 400 мг

№ добр.	C_{\max} , мкг/мл	T_{\max} , ч	$AUC_{(0-72)}$, мкг*ч/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	C_{\max}/AUC , ч ⁻¹	$AUC_{(0-72)}/AUC_{(0-\infty)}$
1	5,39	3,00	75,28	0,058	79,78	12,02	14,86	0,072	0,94
2	3,93	0,50	36,63	0,107	36,63	6,46	8,84	0,107	1,00
3	5,15	1,00	35,05	0,105	35,05	6,60	8,02	0,147	1,00
4	5,60	0,50	53,63	0,097	53,63	7,15	9,11	0,104	1,00
5	8,72	2,00	95,88	0,046	107,98	14,98	20,26	0,091	0,89
6	3,01	1,00	42,37	0,073	42,37	9,56	11,10	0,071	1,00
7	3,73	1,00	59,14	0,062	59,14	11,12	11,45	0,063	1,00
8	3,85	1,50	45,25	0,144	45,25	4,81	8,58	0,085	1,00
9	2,43	1,50	31,05	0,077	31,05	8,97	11,49	0,078	1,00
10	3,08	0,50	31,88	0,075	31,88	9,24	10,34	0,097	1,00
Ср. знач	4,49	1,25	50,62	0,084	52,28	9,09	11,41	0,092	0,98
Ср. геом	4,20	1,05	47,28	0,080	48,12	8,64	10,97	0,089	0,98
SD	1,83	0,79	21,10	0,029	24,64	3,03	3,69	0,024	0,04
CV, %	40,73	63,25	41,69	34,412	47,14	33,37	32,39	26,644	3,85
Median	3,89	1,00	43,81	0,076	43,81	9,10	10,72	0,088	1,00
Дов.инт.	0,95	0,41	10,98	0,015	12,82	1,58	1,92	0,013	0,02
L-90 %	3,54	0,84	39,64	0,069	39,46	7,51	9,49	0,079	0,96
U - 90 %	5,44	1,66	61,59	0,100	65,09	10,67	13,33	0,104	1,00

Таблица 10

Индивидуальные фармакокинетические параметры перхлозона после приема препарата в дозировке 800 мг

№ добр.	C_{max} , мкг/мл	T_{max} , ч	$AUC_{(0-72)}$, мкг*ч/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	C_{max}/AUC , ч ⁻¹	$AUC_{(0-72)}/AUC_{(0-\infty)}$
1	8,80	1,50	107,08	0,095	107,08	7,29	10,09	0,082	1,00
2	9,47	1,00	94,07	0,111	94,07	6,27	9,28	0,101	1,00
3	8,98	2,00	101,10	0,065	101,10	10,73	11,30	0,089	1,00
4	9,27	1,00	118,41	0,073	121,57	9,51	14,25	0,078	0,97
5	7,03	0,50	75,60	0,120	75,60	5,78	8,51	0,093	1,00
6	4,75	1,50	81,97	0,056	81,97	12,41	12,14	0,058	1,00
7	4,78	1,50	67,96	0,056	67,96	12,35	12,00	0,070	1,00
8	6,02	1,00	71,69	0,090	71,69	7,71	9,89	0,084	1,00
9	5,70	1,00	95,69	0,032	95,69	21,74	13,34	0,060	1,00
10	5,48	1,50	66,85	0,089	66,85	7,79	10,29	0,082	1,00
Ср. знач	7,03	1,25	88,04	0,079	88,35	10,16	11,11	0,080	1,00
Ср. геом	6,79	1,18	86,44	0,074	86,66	9,40	10,98	0,079	1,00
SD	1,93	0,42	17,83	0,027	18,45	4,70	1,83	0,014	0,01
CV, %	27,39	33,99	20,25	34,661	20,88	46,28	16,44	17,236	0,82
Median	6,53	1,25	88,02	0,081	88,02	8,65	10,79	0,082	1,00
Дов.инт.	1,00	0,22	9,28	0,014	9,59	2,44	0,95	0,007	0,005
L-90 %	6,03	1,03	78,76	0,064	78,76	7,71	10,16	0,073	0,99
U - 90 %	8,03	1,47	97,31	0,093	97,95	12,60	12,06	0,087	1,00

Таблица 11

Индивидуальные фармакокинетические параметры перхлозона после приема препарата в дозировке 1200 мг

№ добр.	C_{\max} , мкг/мл	T_{\max} , ч	$AUC_{(0-72)}$, мкг*ч/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	C_{\max}/AUC , ч ⁻¹	$AUC_{(0-72)} / AUC_{(0-\infty)}$
1	11,02	5,00	279,39	0,046	316,25	14,94	25,78	0,039	0,88
2	9,22	2,00	175,42	0,091	177,51	7,66	13,90	0,053	0,99
3	15,93	1,50	248,17	0,080	253,04	8,65	14,08	0,064	0,98
4	14,39	5,00	263,92	0,074	270,76	9,30	15,53	0,055	0,97
5	14,52	3,00	291,02	0,086	295,20	8,04	14,74	0,050	0,99
6	6,35	1,50	109,28	0,041	109,28	16,73	12,87	0,058	1,00
7	6,54	1,50	98,41	0,069	102,01	9,98	15,16	0,066	0,96
8	7,15	1,50	170,58	0,039	193,94	17,80	25,23	0,042	0,88
9	5,49	3,00	118,49	0,046	118,49	15,20	12,98	0,046	1,00
10	5,76	1,50	92,49	0,038	92,49	18,45	12,96	0,062	1,00
Ср. знач	9,64	2,55	184,72	0,061	192,90	12,68	16,32	0,054	0,97
Ср. геом	8,92	2,29	168,80	0,058	174,98	12,00	15,78	0,053	0,96
SD	4,04	1,50	79,50	0,021	85,94	4,33	4,93	0,009	0,05
CV, %	41,93	57,27	43,04	34,500	44,55	34,19	30,18	17,360	4,75
Median	8,19	1,50	173,00	0,058	185,73	12,46	14,41	0,054	0,98
Дов.инт.	2,10	0,78	41,35	0,011	44,70	2,25	2,56	0,005	0,02
L-90 %	7,54	1,83	143,36	0,050	148,20	10,42	13,76	0,049	0,94
U - 90 %	11,74	3,39	226,07	0,072	237,60	14,93	18,89	0,058	0,99

Таблица 12

Индивидуальные фармакокинетические параметры перхлозона для добровольца 1 после приема препарата в дозировке
1600 мг

№ добр.	C_{max}, мкг/мл	T_{max}, ч	AUC₍₀₋₇₂₎, мкг*ч/мл	k_{el}, ч⁻¹	AUC_(0-∞)	t_{1/2}	MRT	C_{max}/AUC	AUC₍₀₋₇₂₎ /AUC_(0-∞)
1	18,08	5,00	495,50	0,072	526,72	9,62	20,98	0,036	0,94

Как видно из представленных данных, Перхлозон быстро всасывался в системный кровоток при пероральном приеме (T_{max} – 1,25 ч для дозировок 400 мг и 800 мг; 2,55 ч для дозировки 1200 мг). Разное время достижения максимальной концентрации в плазме при приеме разных доз препарата может быть связано с лимитированием скорости всасывания препарата при увеличении дозы. Перхлозон практически не обнаруживался в плазме крови спустя 48-72 ч после однократного применения для дозировок 400 мг – 800 мг, либо обнаруживался на очень низких уровнях для дозировки 1200 мг. C_{max} перхлозона составила $4,49 \pm 0,95$ мкг/мл; $7,03 \pm 1,00$ мкг/мл; $9,64 \pm 2,10$ мкг/мл для дозировок 400 мг, 800 мг и 1200 мг, соответственно. AUC_{0-72} перхлозона составила $50,62 \pm 10,98$ мкг*ч/мл; $88,04 \pm 9,28$ мкг*ч/мл; $184,7 \pm 41,35$ мкг*ч/мл для дозировок 400 мг, 800 мг и 1200 мг, соответственно. Фармакокинетика в диапазоне доз 400 мг – 1200 мг является линейной по C_{max} ($r^2 = 0,9999$) и несколько менее выражено для AUC ($r^2 = 0,94$), графики линейности приведены на Рис. 11-12. Период полувыведения перхлозона составил около 9 – 12 ч, среднее время удерживания – около 11-16 ч. Для единственного добровольца, у которого были установлены фармакокинетические параметры после приема дозировки 1600 мг, величина C_{max} составила 18,08 мг/мл, AUC_{0-72} – 495,50 мкг/мл. Усредненные и индивидуальные фармакокинетические профили перхлозона приведены на Рис. 13 – 20 и 21 – 54.

На фоне курсового применения препарата была определена равновесная (стационарная) концентрация. Для этого у пациентов на очередном визите за 10-15 минут до приема дозы препарата был проведен забор крови для последующего фармакокинетического анализа.

Индивидуальные значения равновесных концентраций перхлозона приведены в Таблице 13.

Таблица 13

Индивидуальные значения равновесных концентраций перхлорона

№ пац/№ визита	C _{ss} , мкг/мл						
	2	3	4	5	6	7	8
1.	0,00	4,82	0,57	5,68	5,15	0,42	0,00
2.	0,00	6,70	5,09	4,24	2,65	5,55	0,00
3.	0,00	3,15	0,56	2,54	3,72	2,59	0,00
4.	0,00	6,60	5,68	0,41	2,69	3,67	0,00
5.	0,00	1,62	5,09	0,86	4,97	0,44	0,00
6.	0,00	1,43	0,39	1,16	1,23	0,64	0,00
7.	0,00	5,40	6,94	6,51	1,64	3,94	0,00
8.	0,00	2,91	0,68	1,24	0,40	1,23	0,00
9.	0,00	2,01	2,78	3,07	1,75	0,43	0,00
10.	0,00	1,41	2,15	0,89	1,54	2,14	0,00
11.	0,00	0,66	0,43	0,40	0,63	0,67	0,00
12.	0,00	4,67	1,78	0,61	3,25	*	0,00
13.	*	*	3,17	3,71	4,18	2,09	0,00
Среднее	0,00	3,45	2,72	2,41	2,60	1,98	0,00
SD	0,00	2,12	2,30	2,08	1,57	1,68	0,00
CV, %	0,00	61,52	84,64	86,33	60,51	84,84	0,00
Min	0,00	0,66	0,39	0,40	0,40	0,42	0,00
Max	0,00	6,70	6,94	6,51	5,15	5,55	0,00

*- проба отсутствовала

Усредненный профиль равновесной концентрации перхлорона в плазме крови на приведен на Рисунке 10.

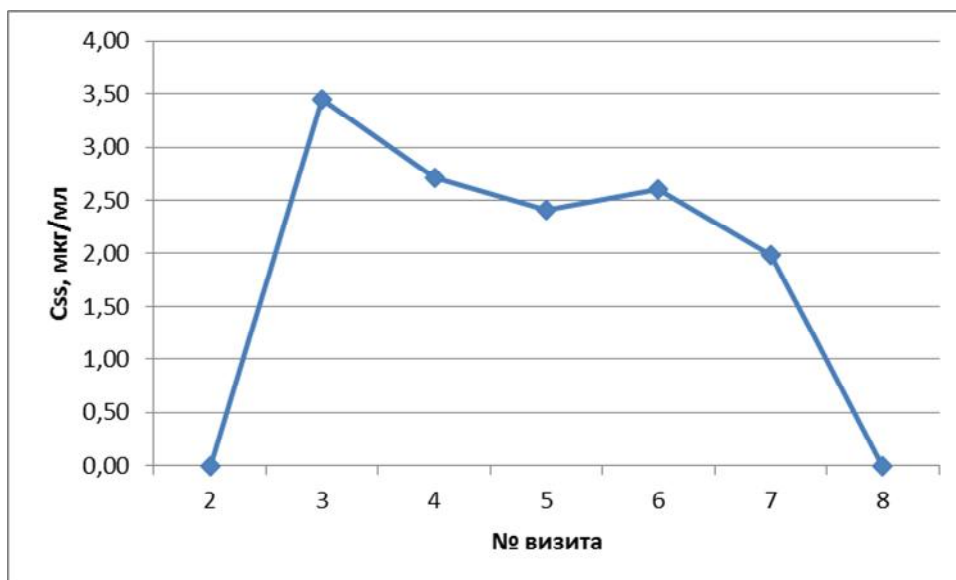


Рисунок 10. Усредненный профиль равновесной концентрации перхлозона в плазме крови.

В период с 3 по 7 визита в плазме крови пациентов (n=13) установилась равновесная концентрация (C_{ss}) перхлозона, которая составила от около 3,45 мкг/мл (визит 3) до 1,98 мкг/мл (визит 7). Разброс индивидуальных значений равновесных концентраций перхлозона составил от 0,39 мкг/мл (min) до 6,94 мкг/мл (max). К восьмому визиту (после завершения приема препарата) перхлозона в плазме обнаружено не было.

Полученные в ходе настоящего исследования фармакокинетические параметры достоверно отличаются от описанных в доступной литературе [73]. Параметры T_{max}, t_{1/2}, рассчитанные в данном исследовании, в среднем меньше, а C_{max} больше, чем в работе А.М. Власова и др.

Примеры типичных хроматограмм, полученных в ходе исследования фармакокинетики и записанных с применение хроматографической системы Agilent 1200, представлены на Рисунках 55 – 82.

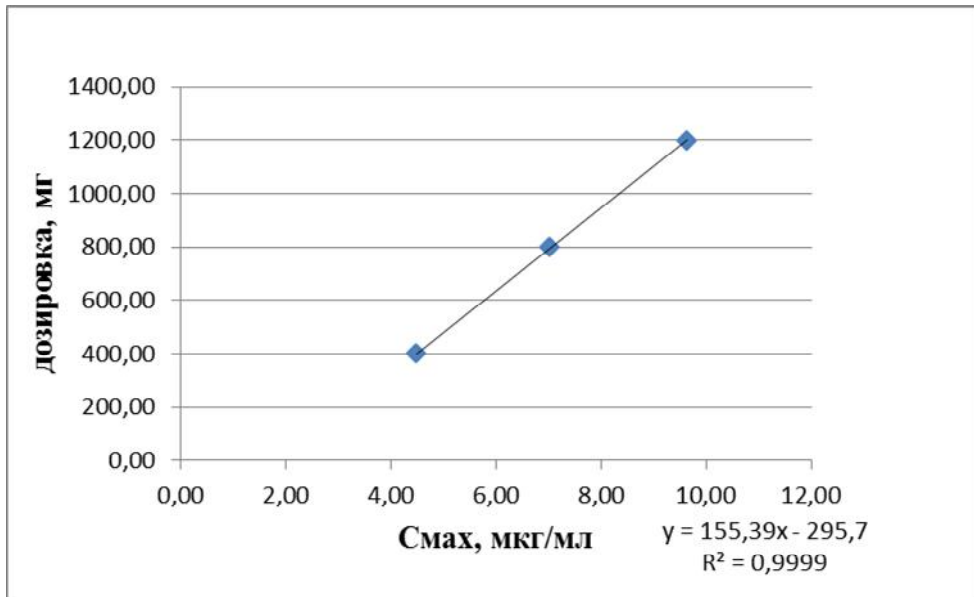


Рисунок 11. Линейность фармакокинетики перхлозона по параметру C_{max} .

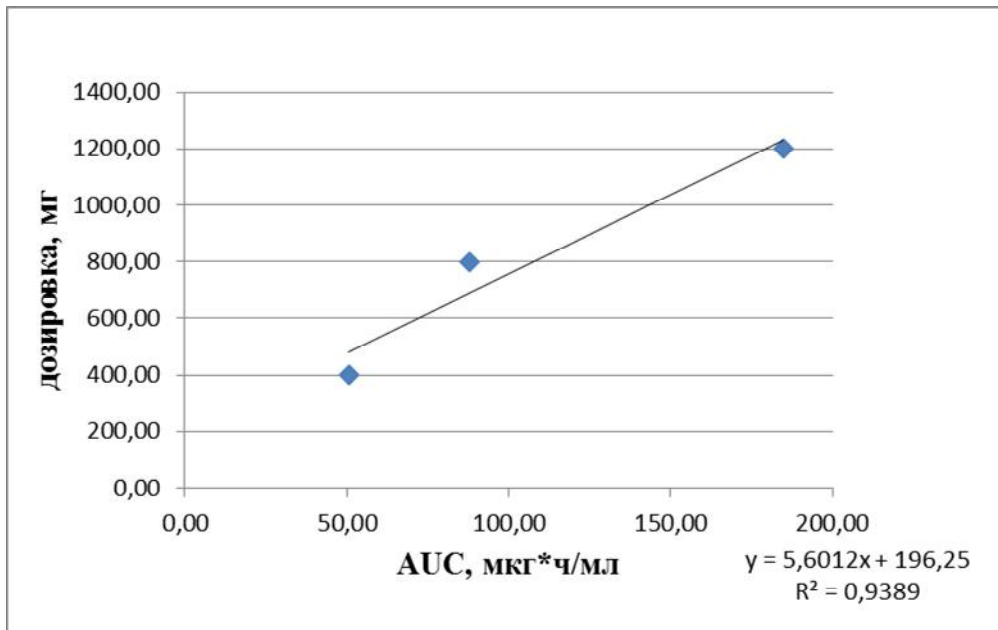


Рисунок 12. Линейность фармакокинетики перхлозона по параметру AUC.

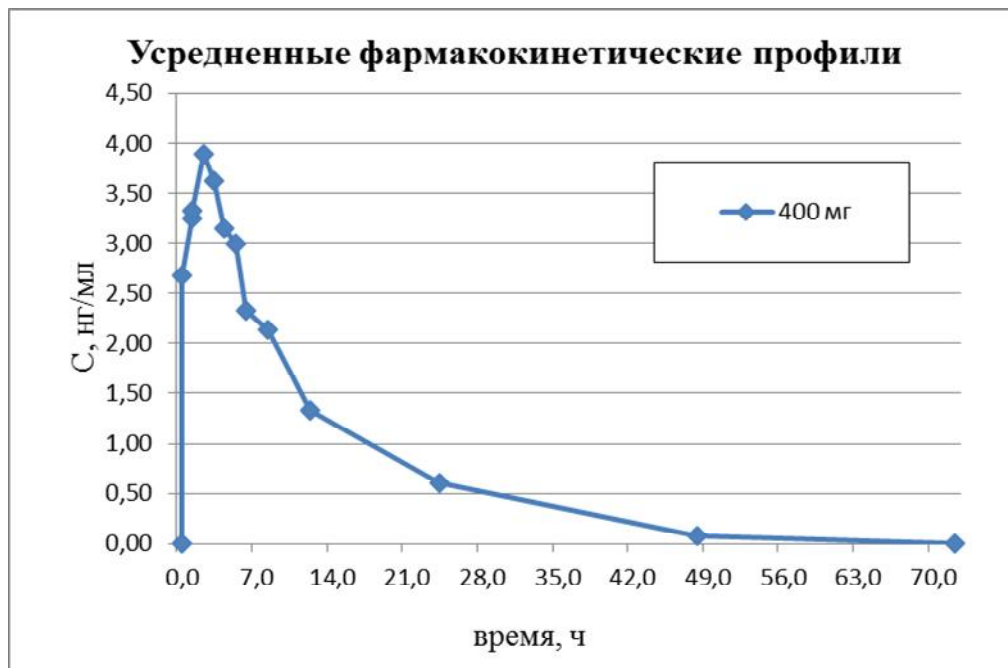


Рисунок 13. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлозон после однократного перорального приема 400 мг.

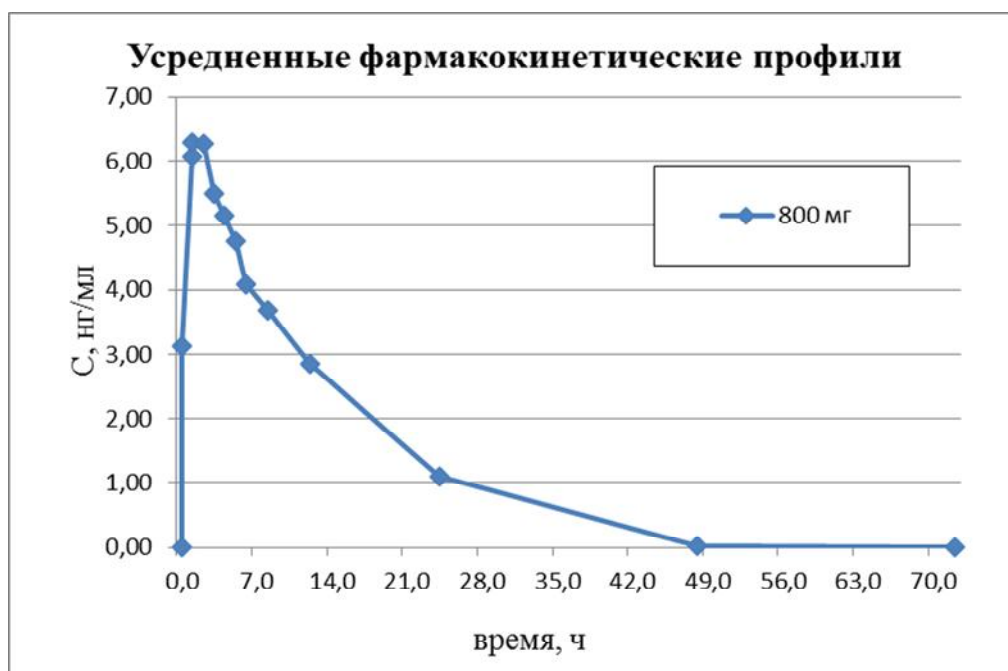


Рисунок 14. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлозон после однократного перорального приема 800 мг.

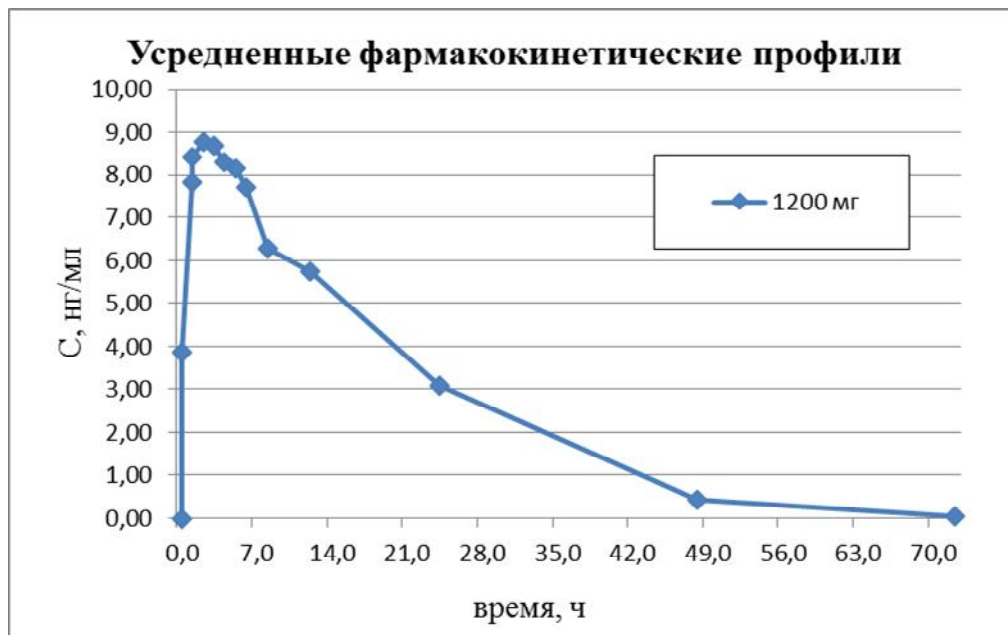


Рисунок 15. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлзон после однократного перорального приема 1200 мг.

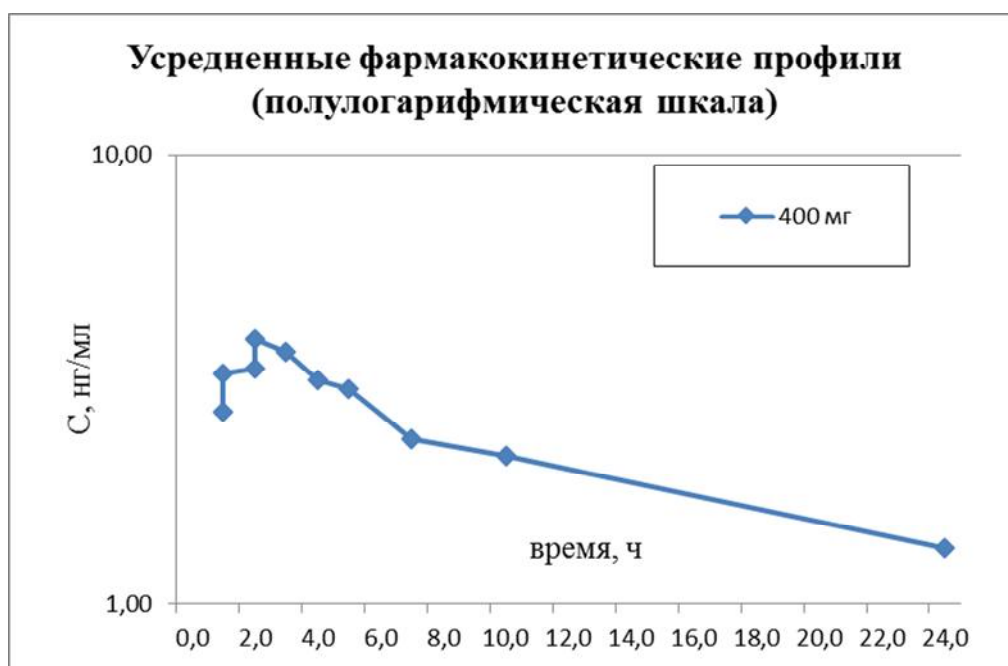


Рисунок 16. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлзон после однократного перорального приема 400 мг (полулогарифмическая шкала).

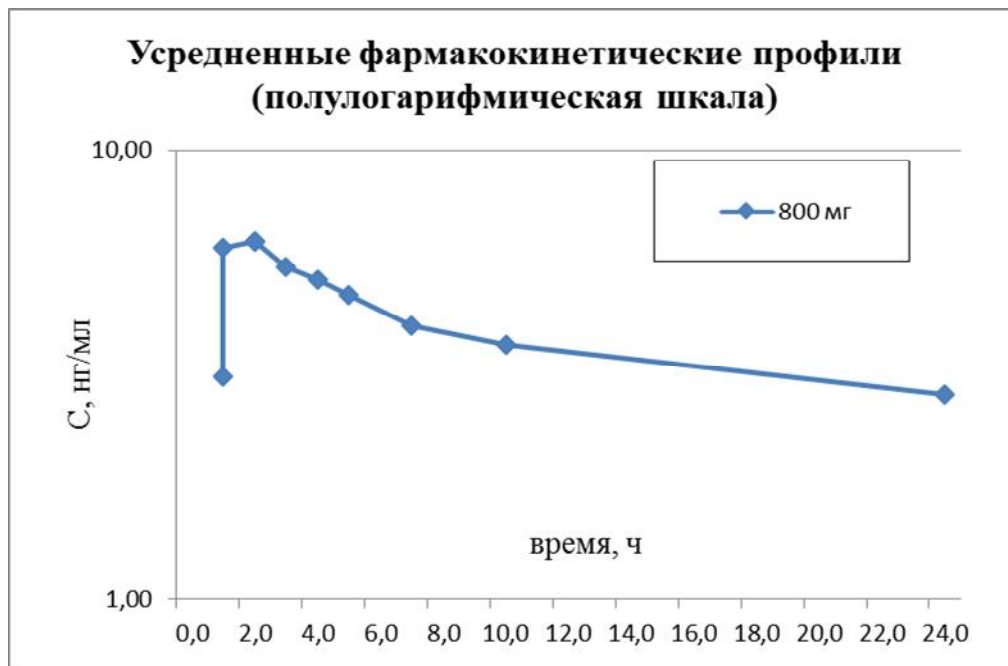


Рисунок 17. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлозон после однократного перорального приема 800 мг (полулогарифмическая шкала).

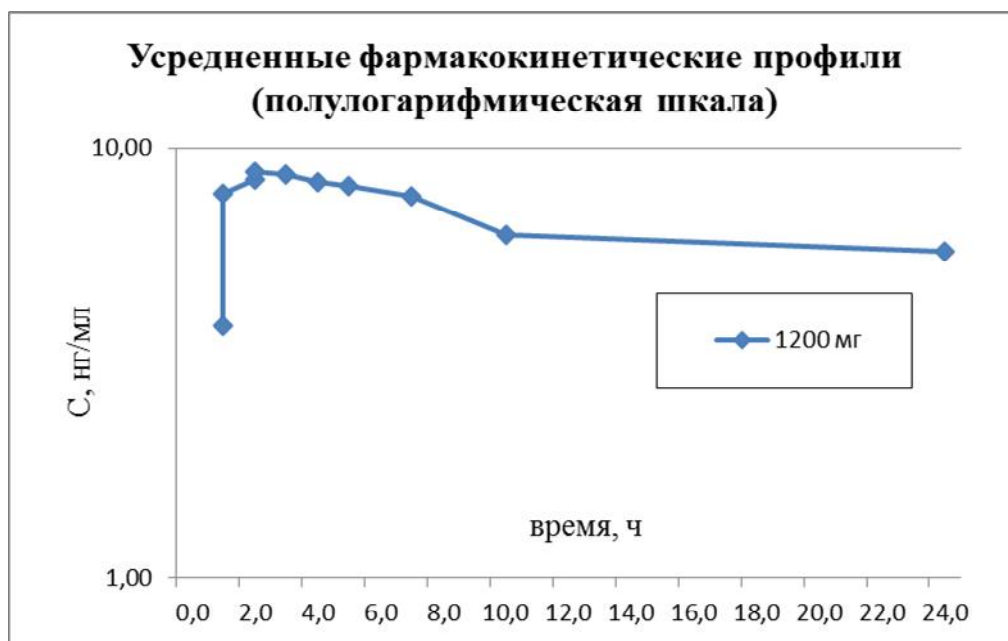


Рисунок 18. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлозон после однократного перорального приема 1200 мг (полулогарифмическая шкала).

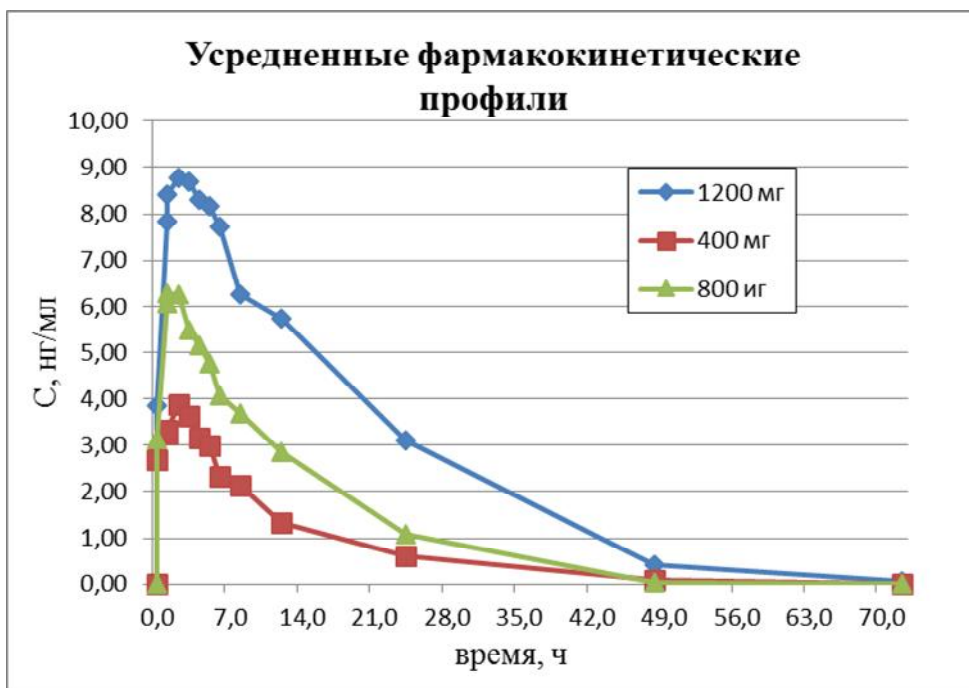


Рисунок 19. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлозон (после однократного перорального приема 400 мг, 800 мг, 1200 мг).

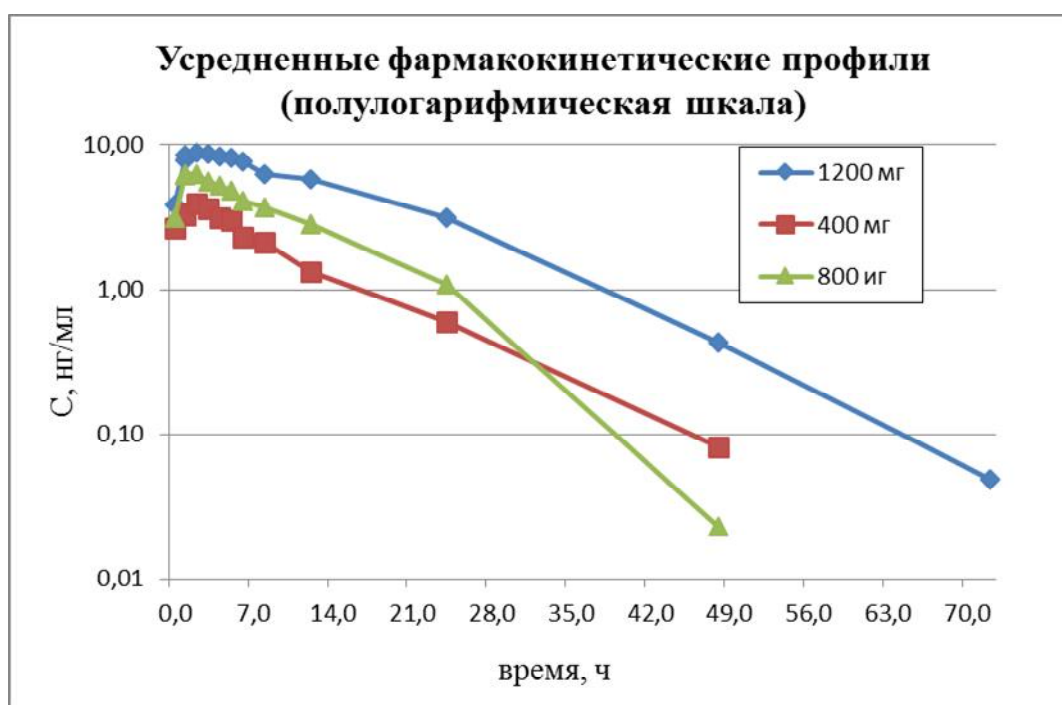


Рисунок 20. Усредненные фармакокинетические профили препарата Перхлозон (после однократного перорального приема 400 мг, 800 мг, 1200 мг).

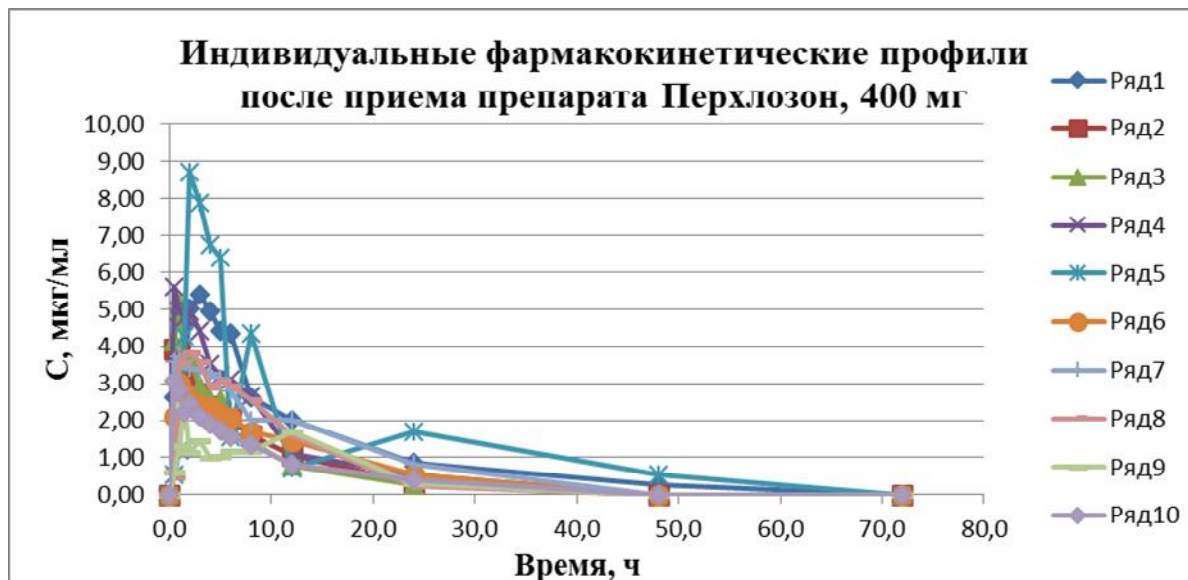


Рисунок 21. Индивидуальные фармакокинетические профили препарата Перхлозон, 400 мг.

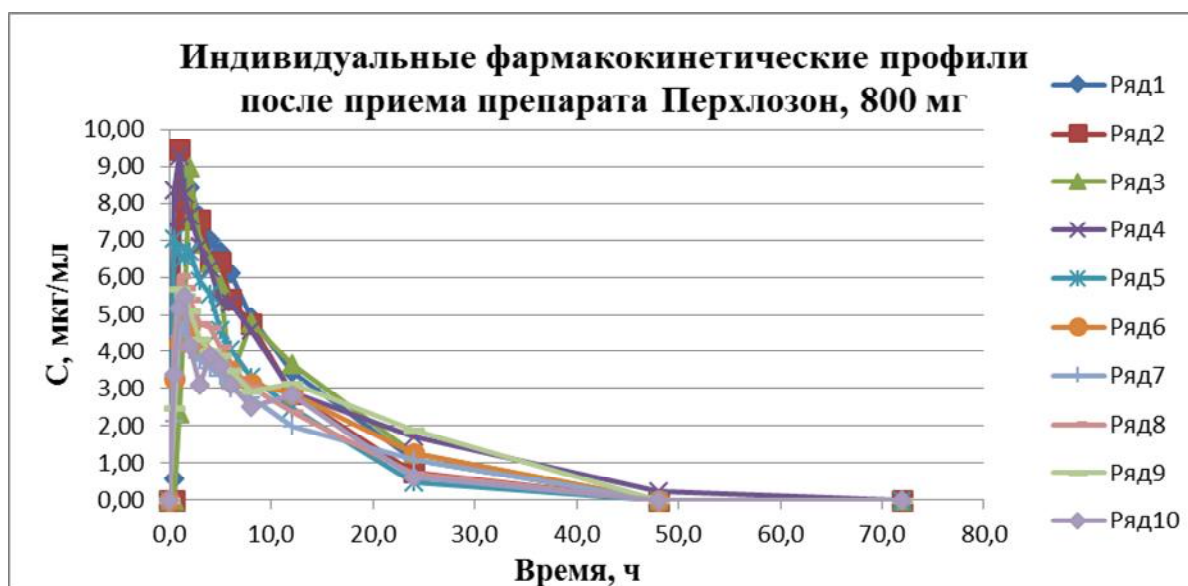


Рисунок 22. Индивидуальные фармакокинетические профили препарата Перхлозон, 800 мг.

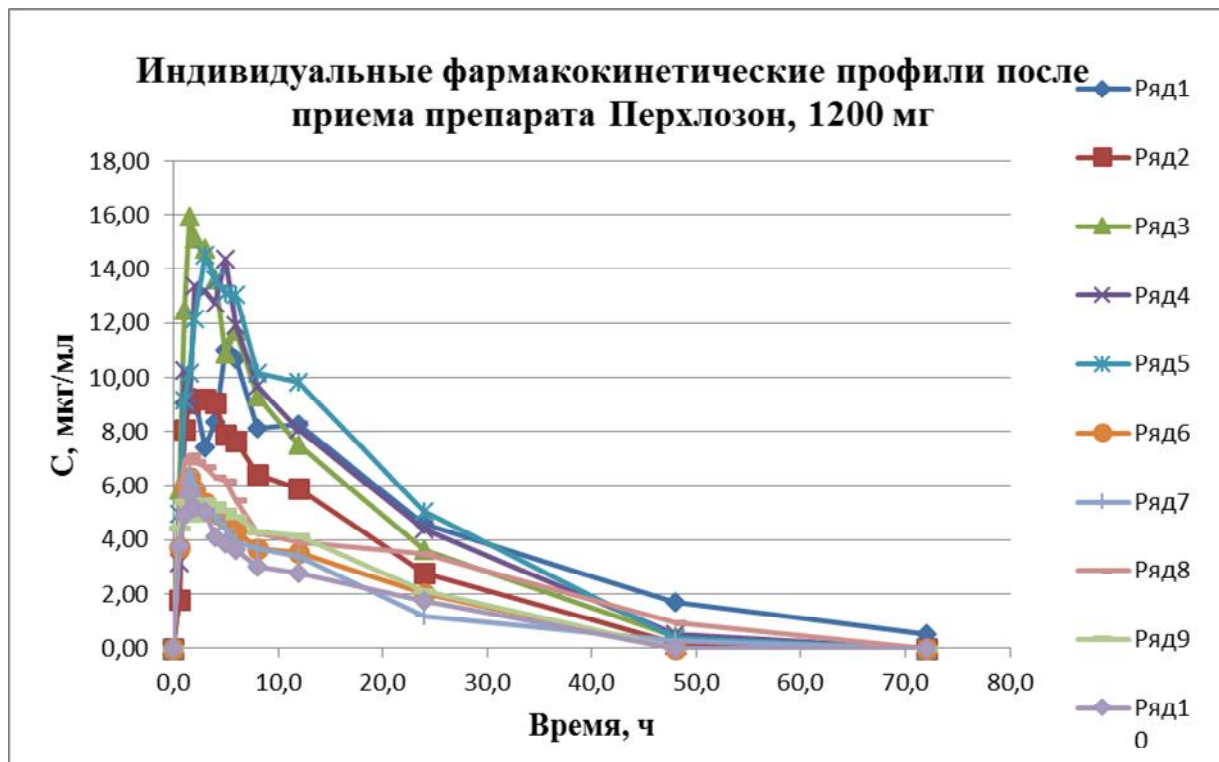


Рисунок 23. Индивидуальные фармакокинетические профили препарата Перхлозон, 1200 мг.

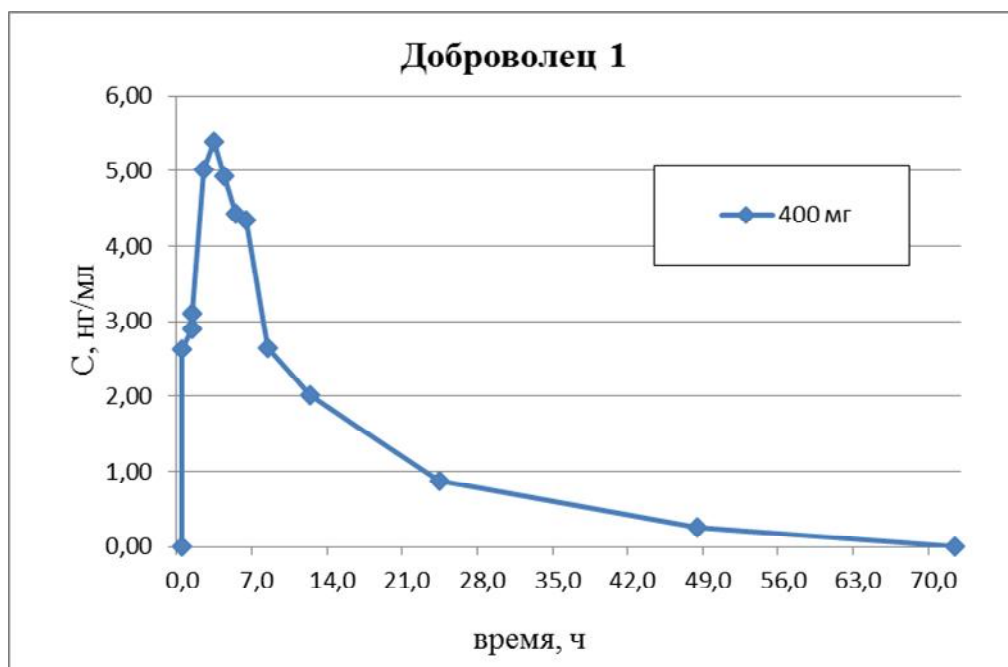


Рисунок 24. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 1, 400 мг.

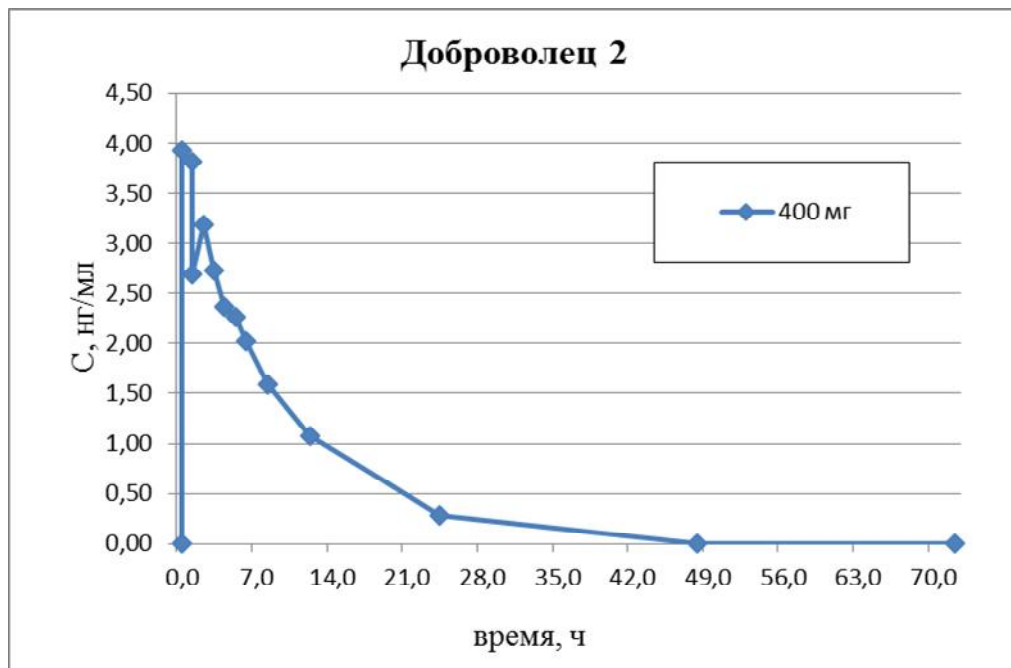


Рисунок 25. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 2, 400 мг.

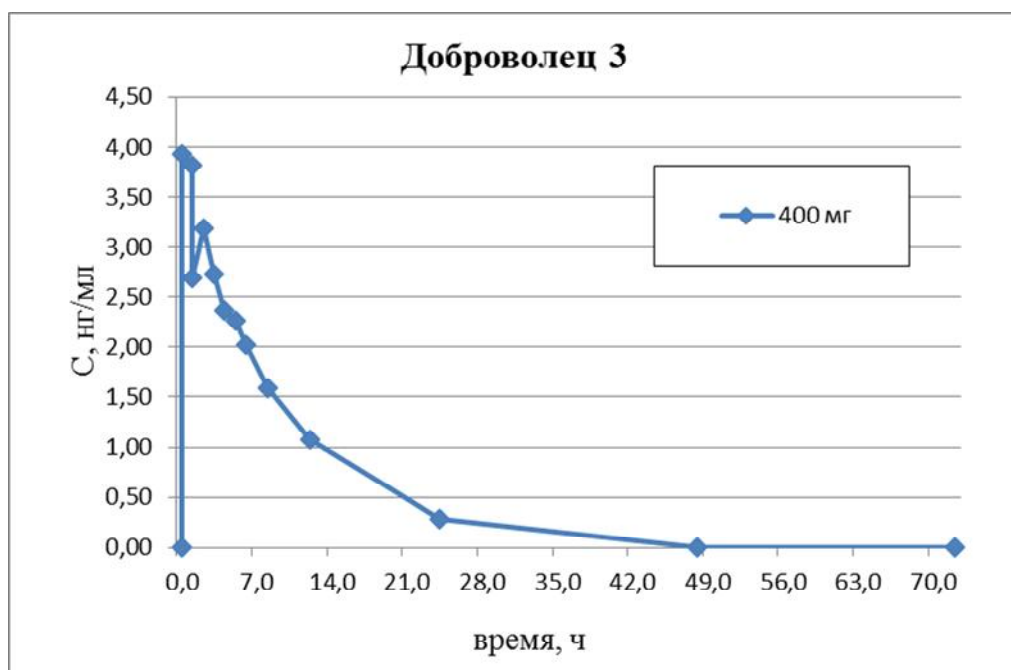


Рисунок 26. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 3, 400 мг.

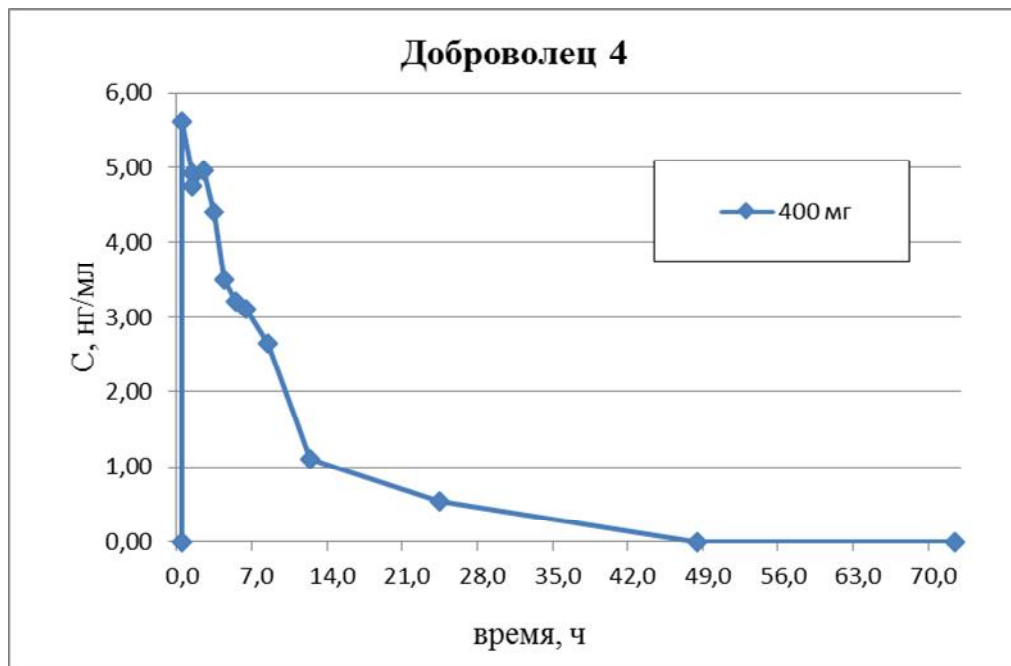


Рисунок 27. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 4, 400 мг.

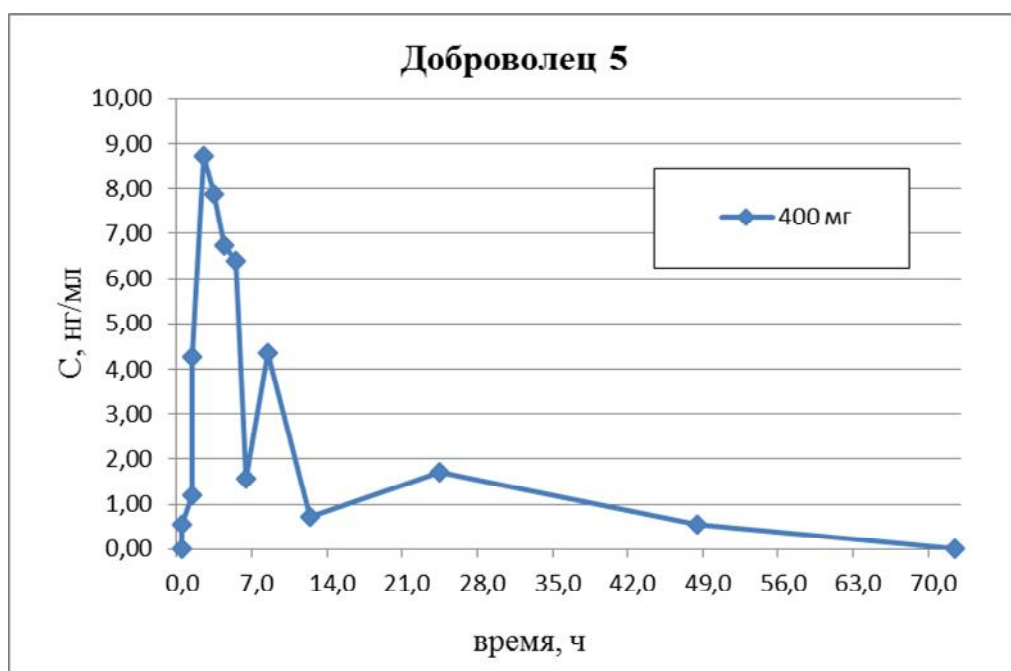


Рисунок 28. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 5, 400 мг.

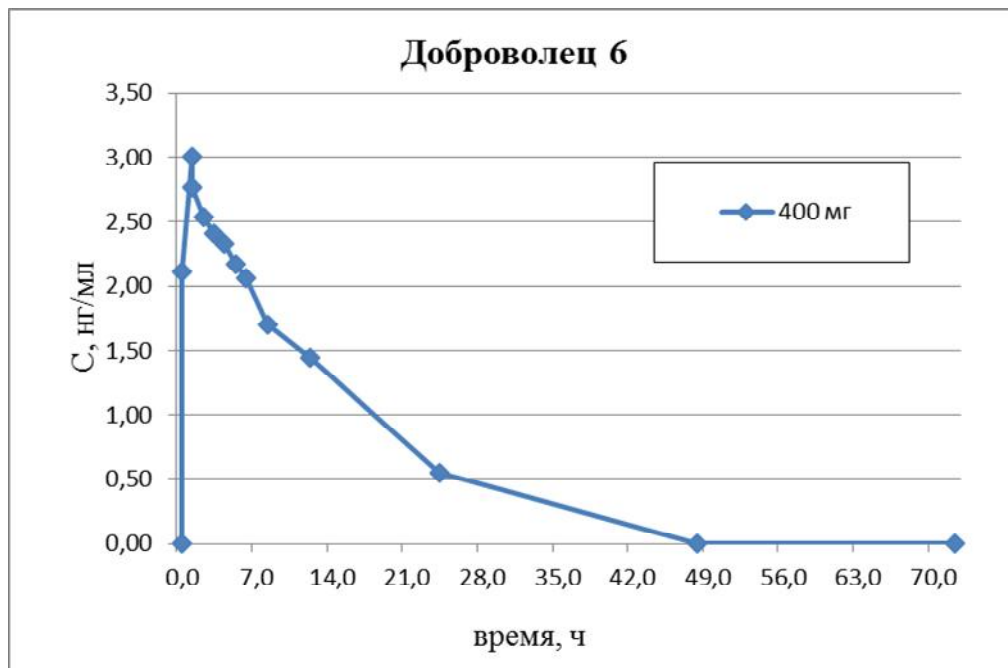


Рисунок 29. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 6, 400 мг.

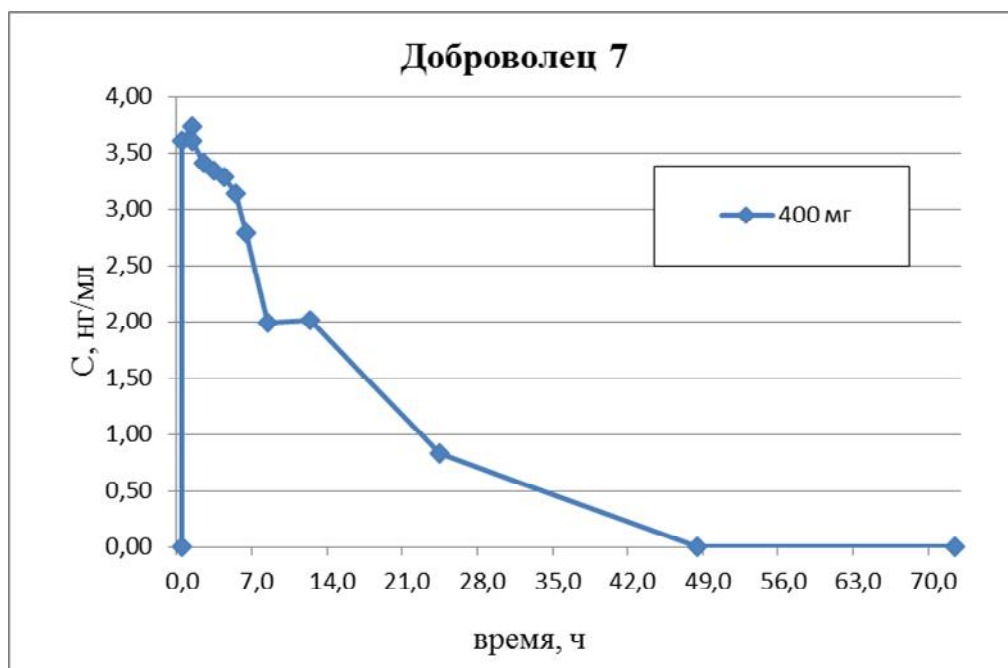


Рисунок 30. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 7, 400 мг.

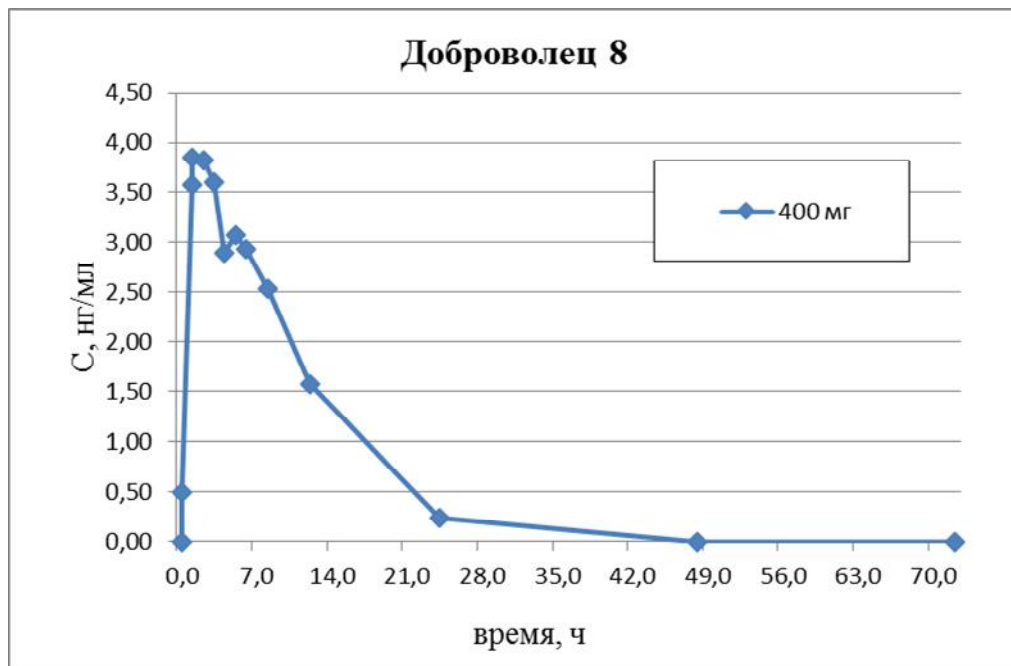


Рисунок 31. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 8, 400 мг.

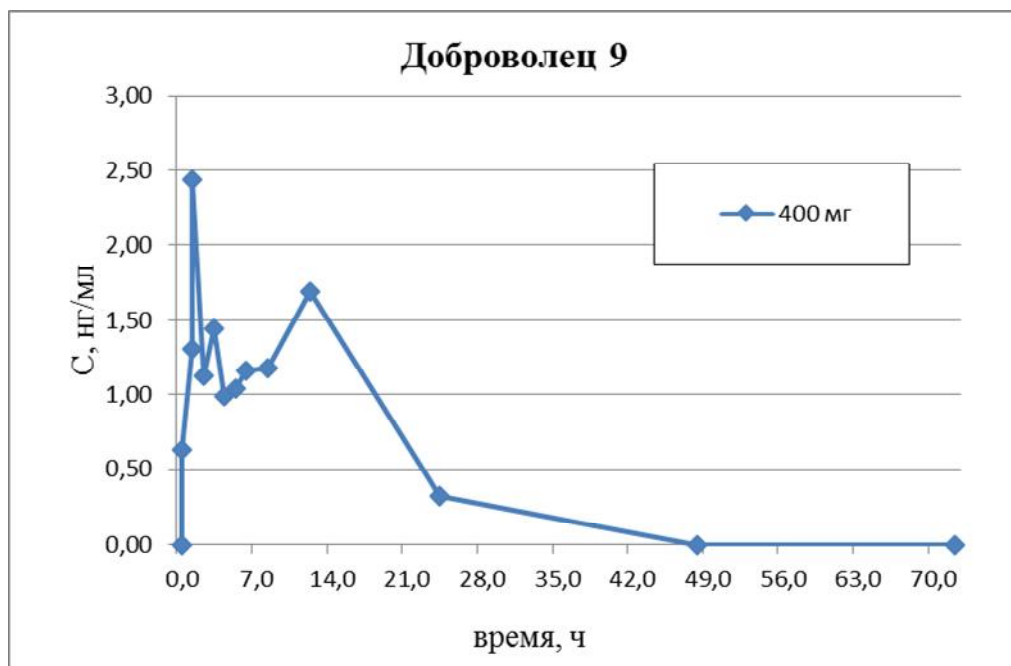


Рисунок 32. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 9, 400 мг.

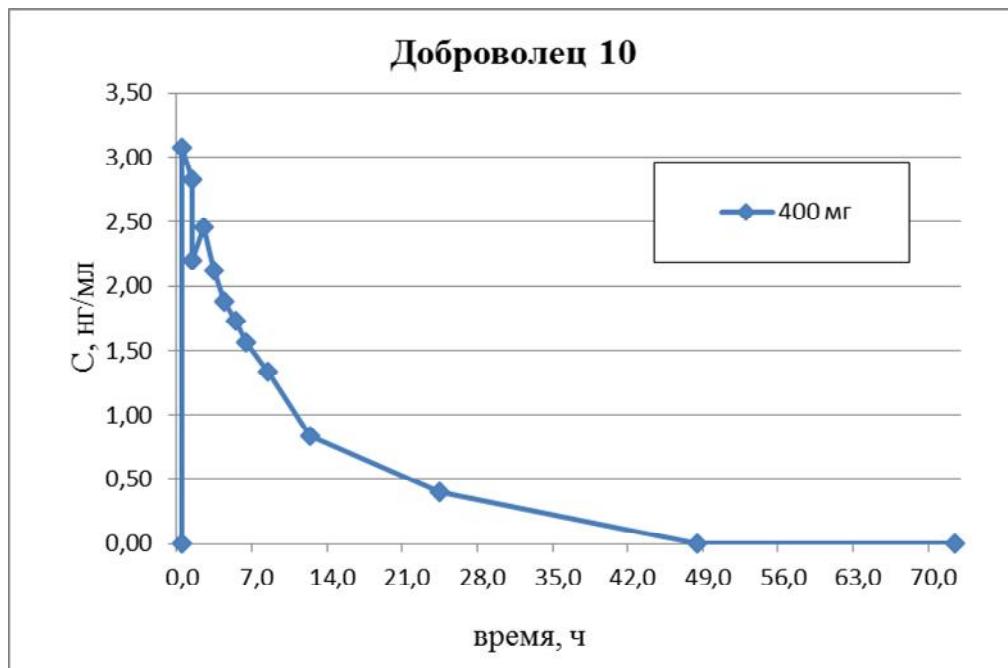


Рисунок 33. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 10, 400 мг.

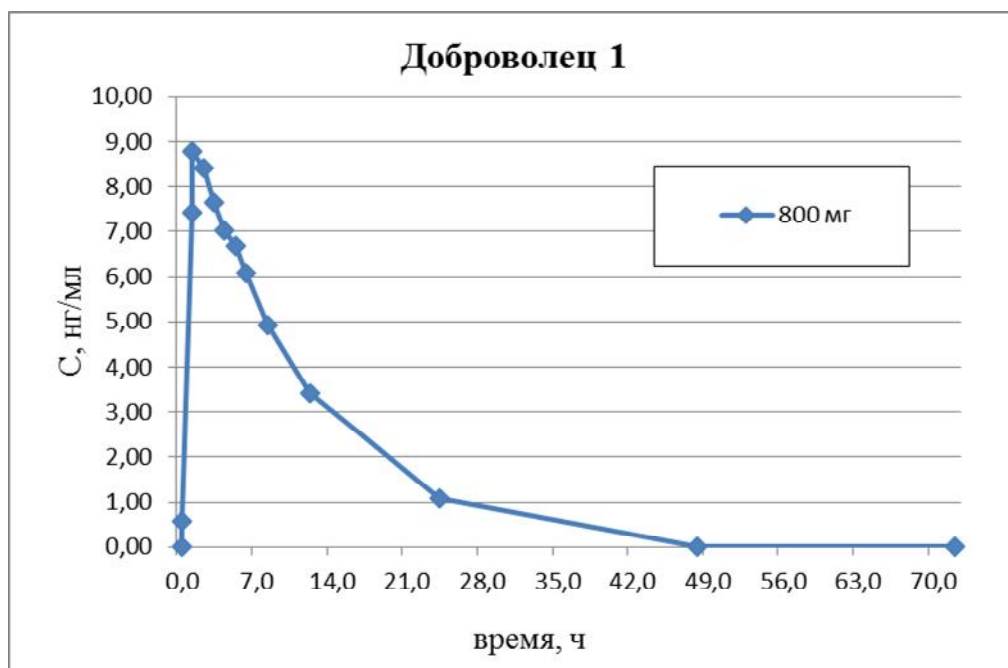


Рисунок 34. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 1, 800 мг.

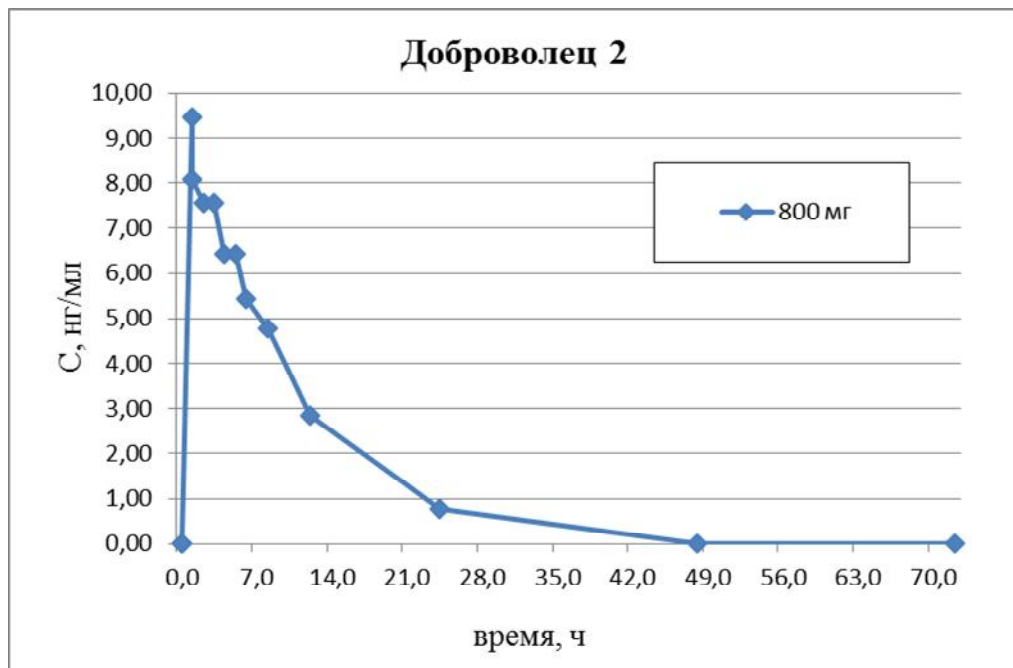


Рисунок 35. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 2, 800 мг.

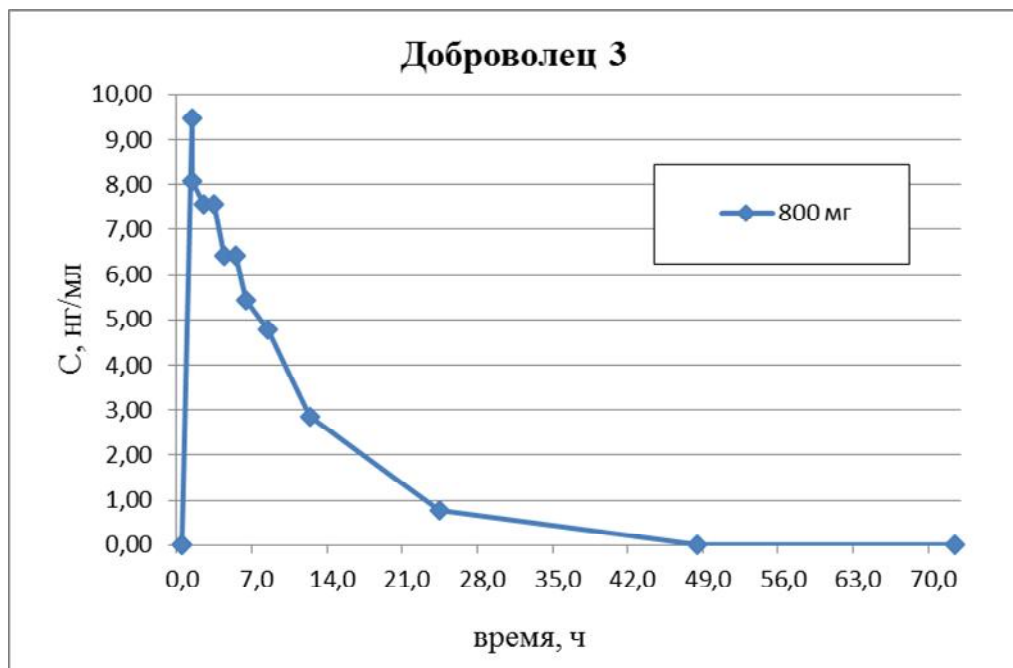


Рисунок 36. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 3, 800 мг.

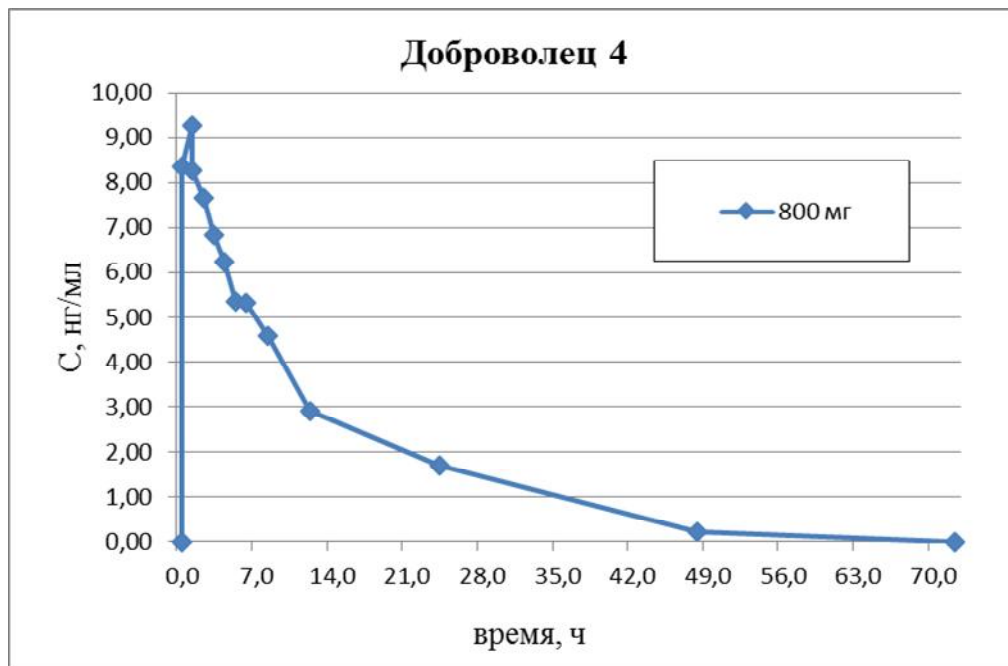


Рисунок 37. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 4, 800 мг.

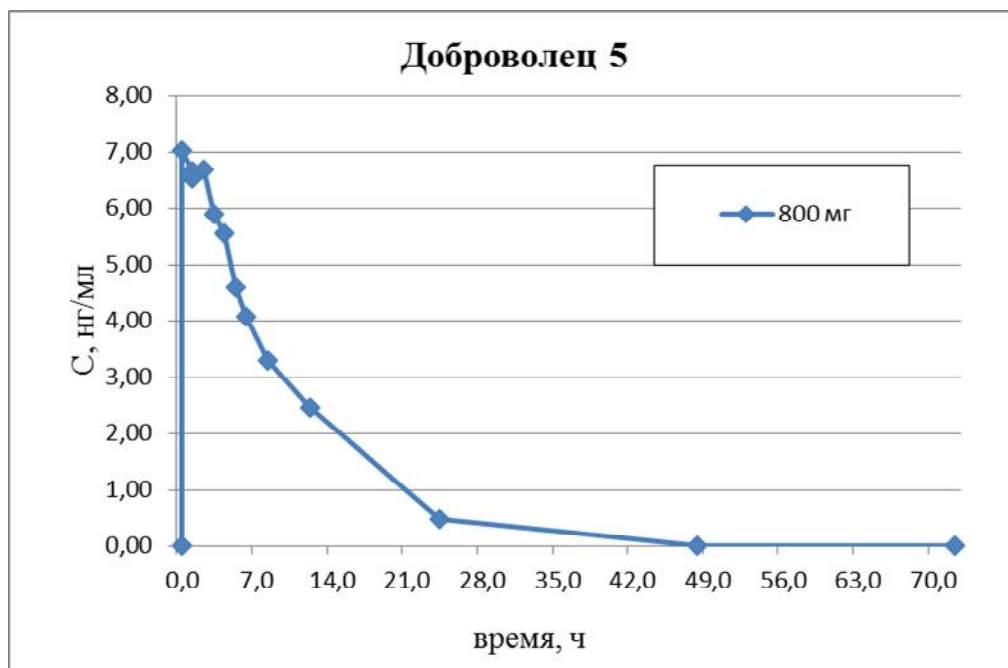


Рисунок 38. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 5, 800 мг.

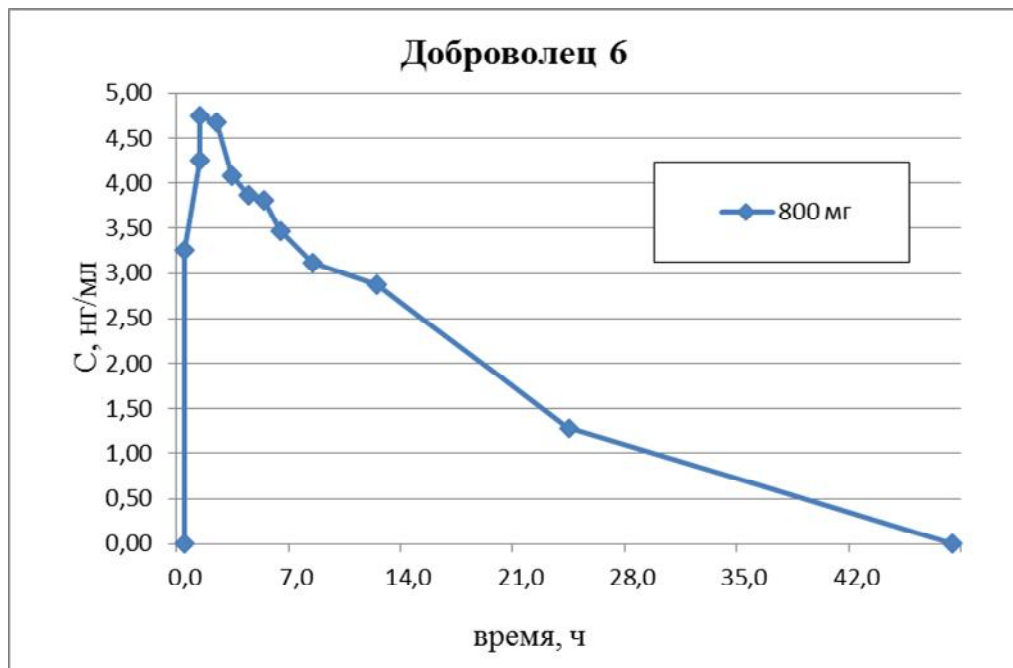


Рисунок 39. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 6, 800 мг.

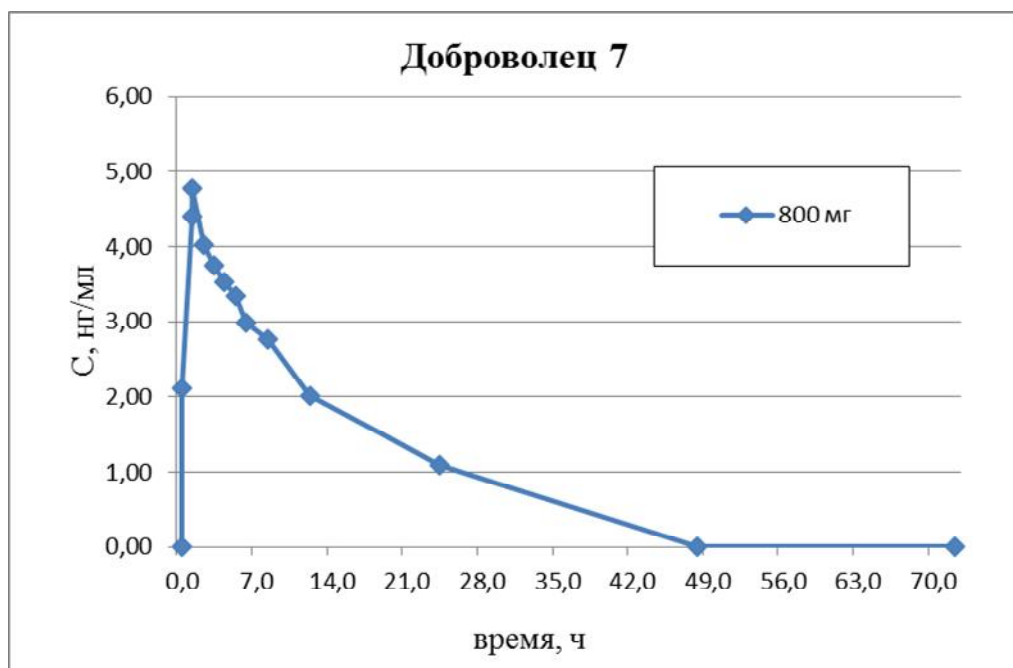


Рисунок 40. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 7, 800 мг.

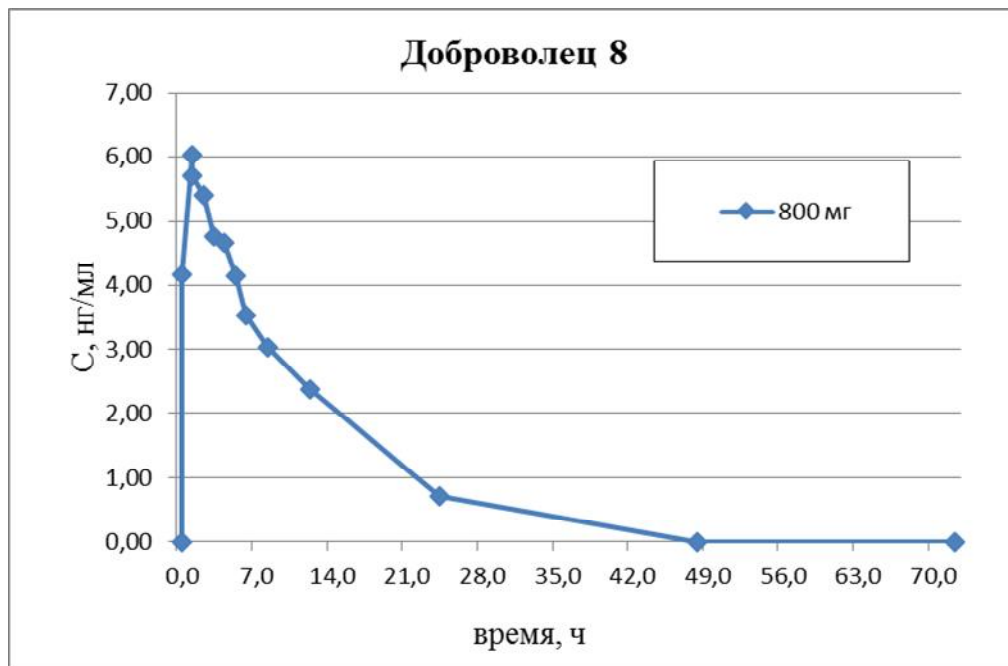


Рисунок 41. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 8, 800 мг.

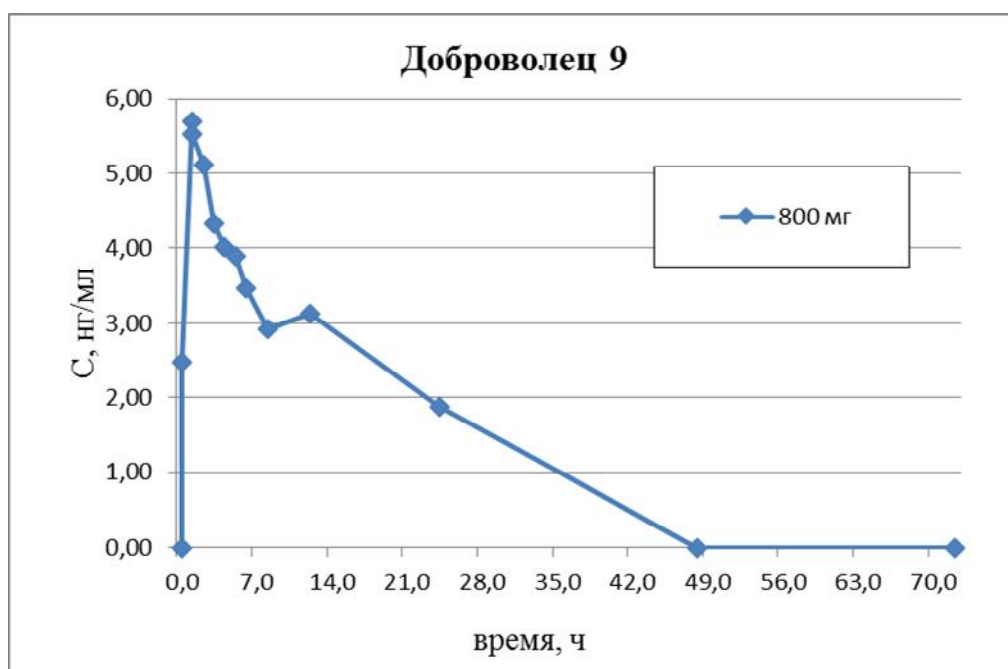


Рисунок 42. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 9, 800 мг.

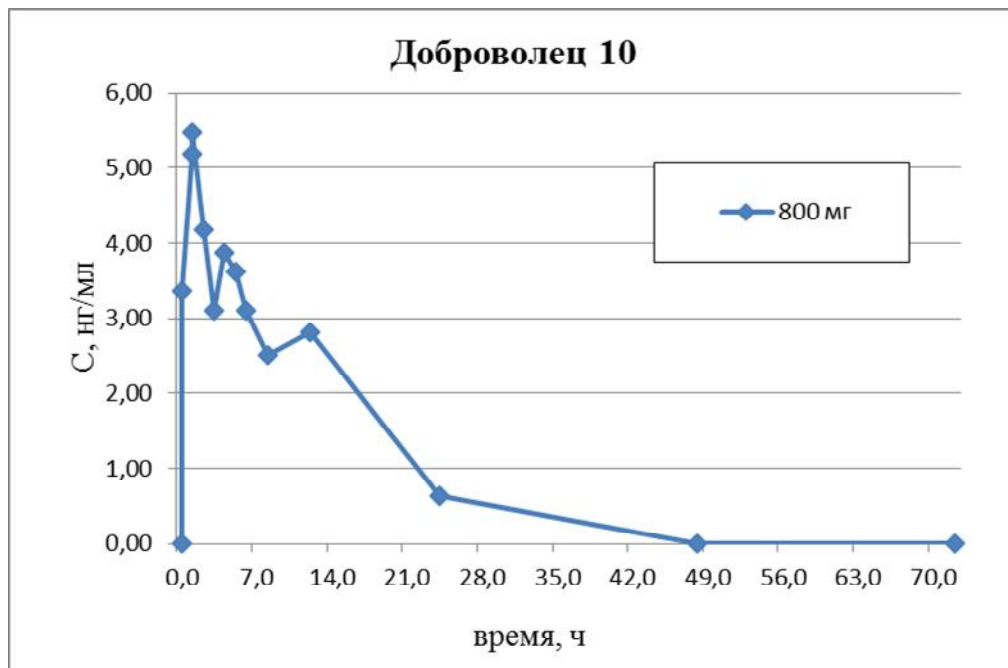


Рисунок 43. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 10, 800 мг.

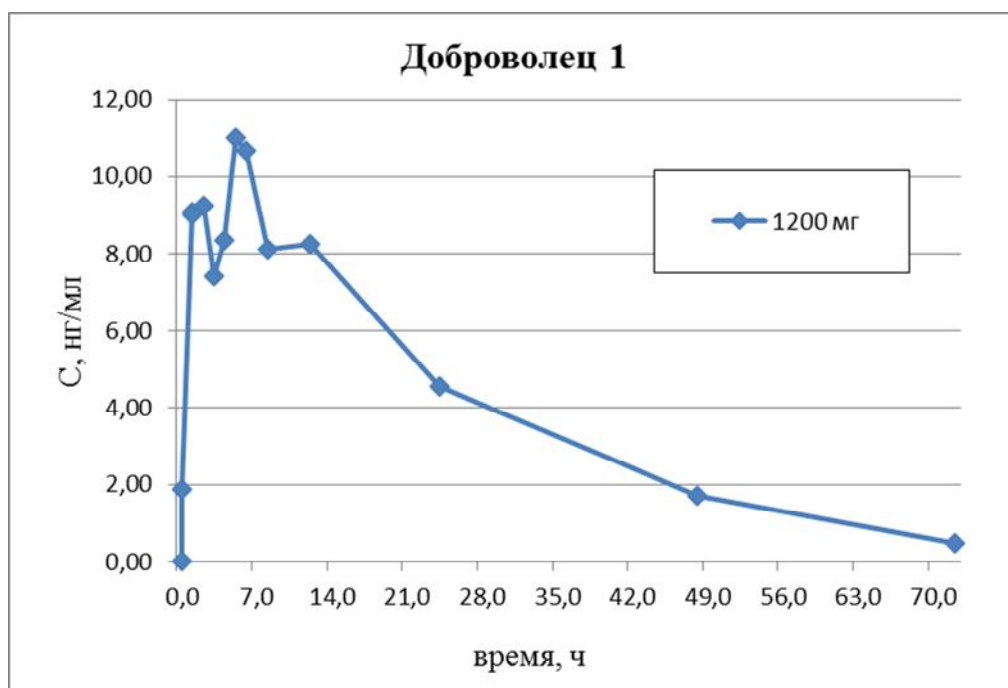


Рисунок 44. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 1, 1200 мг.

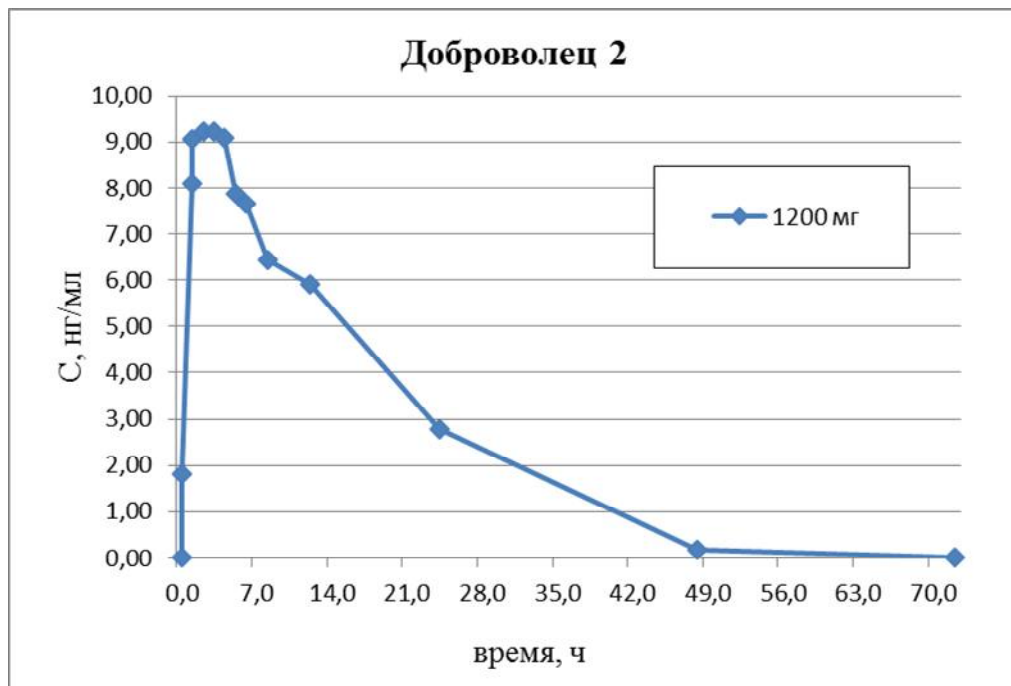


Рисунок 45. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 2, 1200 мг.

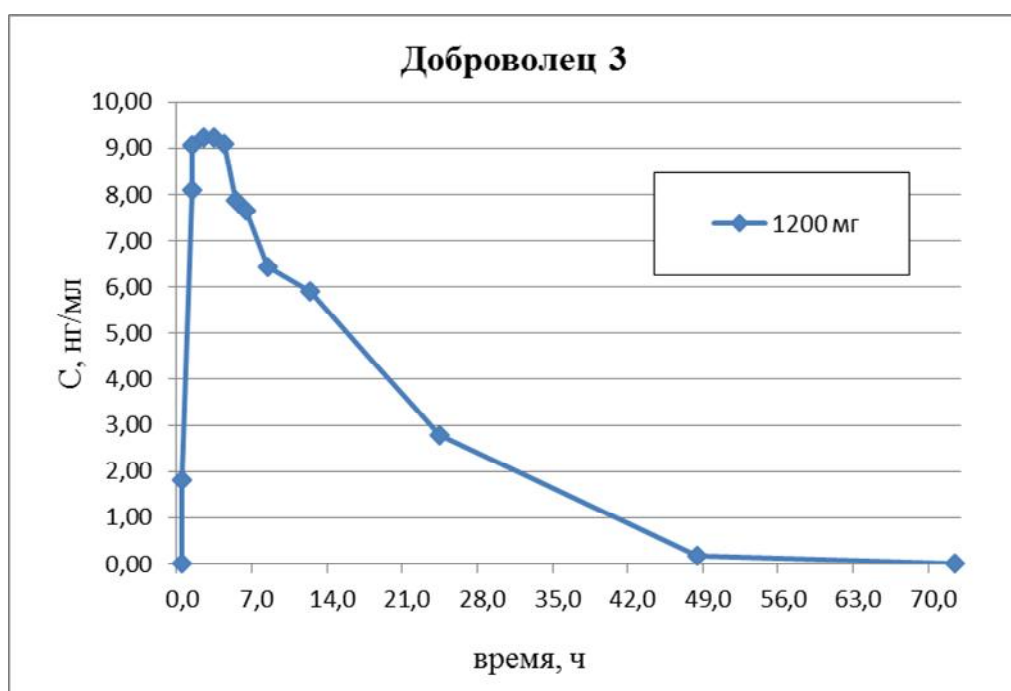


Рисунок 46. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 3, 1200 мг.

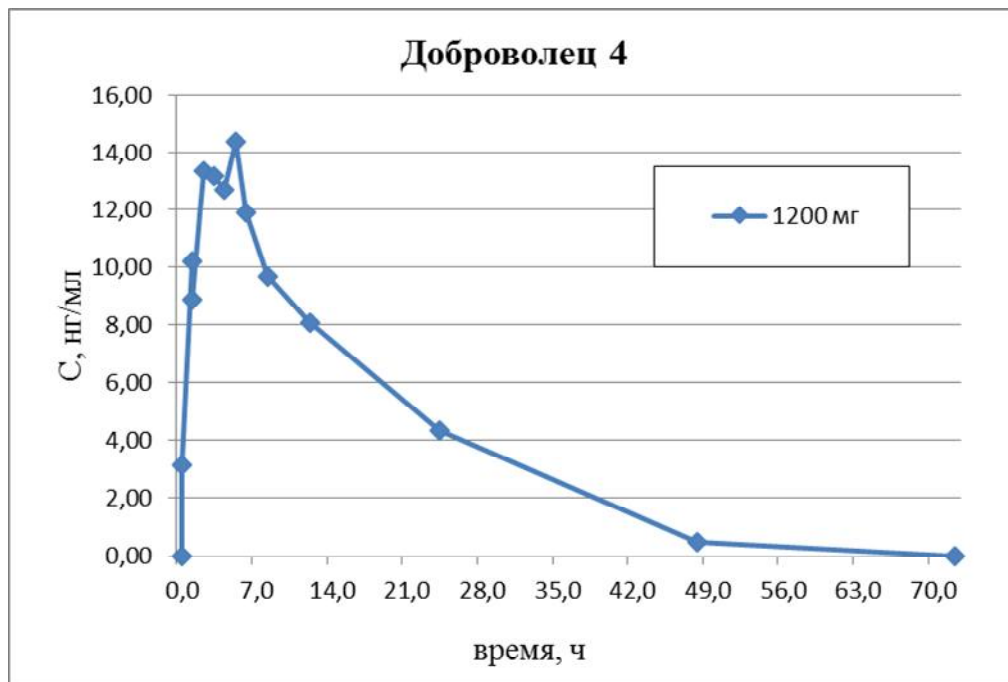


Рисунок 47. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 4, 1200 мг.

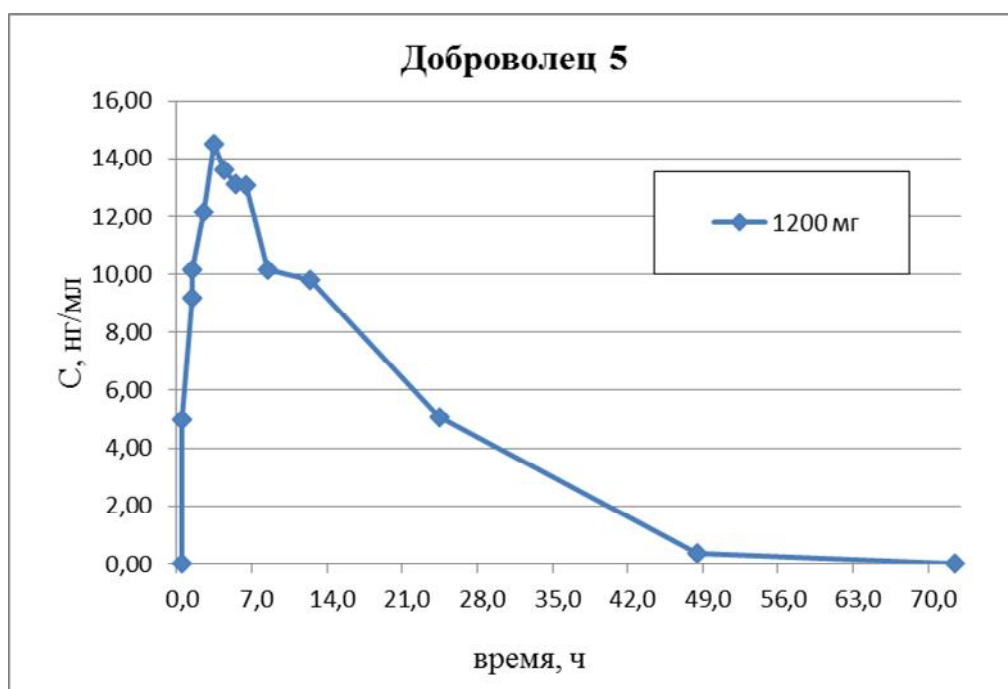


Рисунок 48. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 5, 1200 мг.

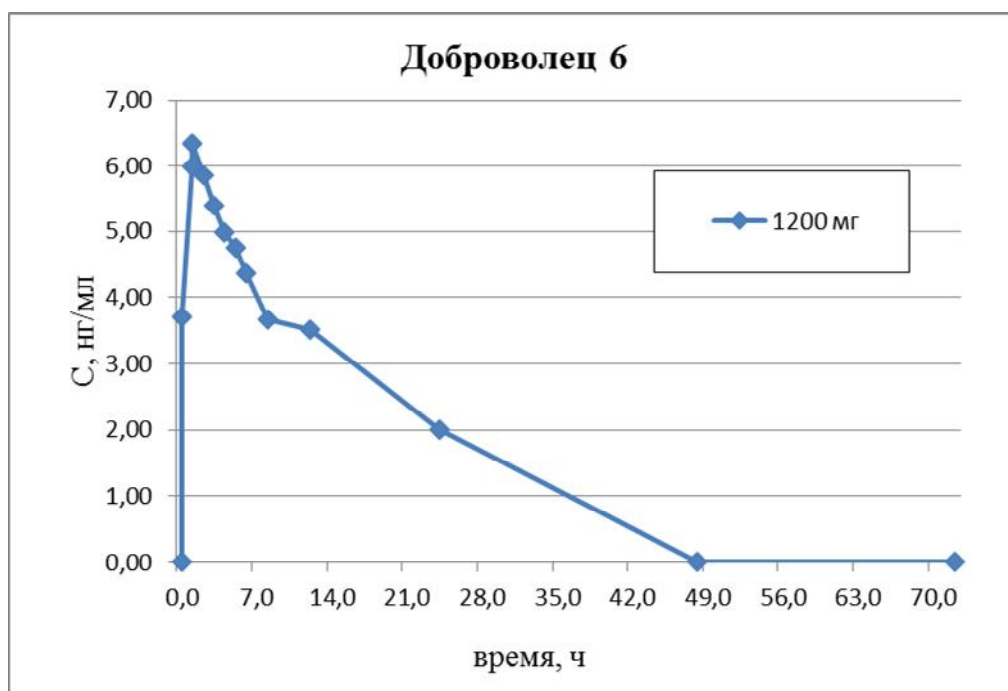


Рисунок 49. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 6, 1200 мг.

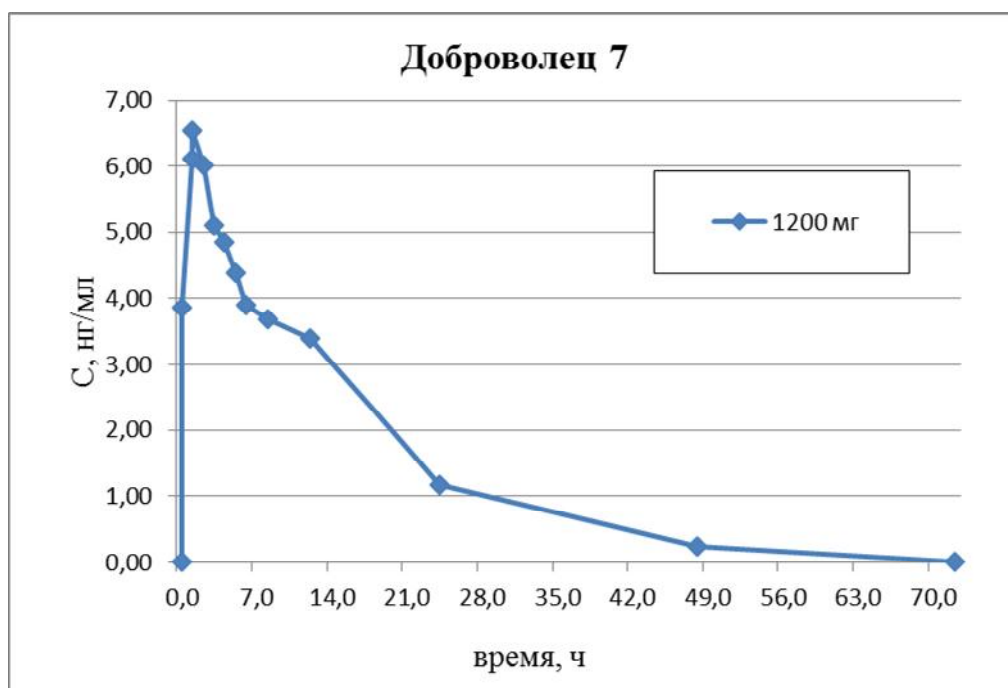


Рисунок 50. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 7, 1200 мг.

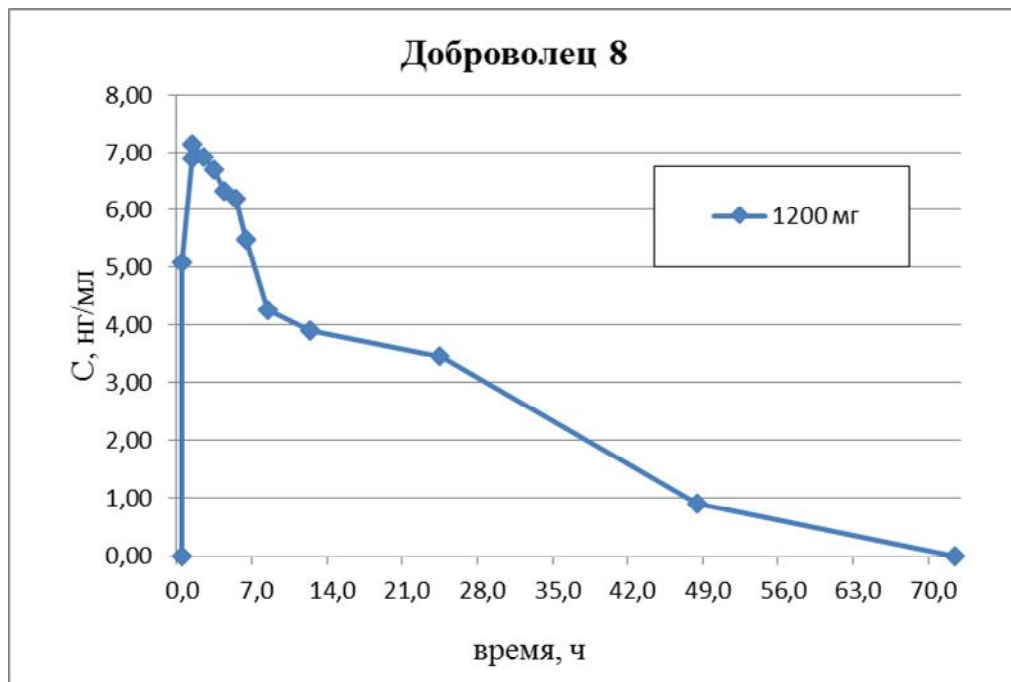


Рисунок 51. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 8, 1200 мг.

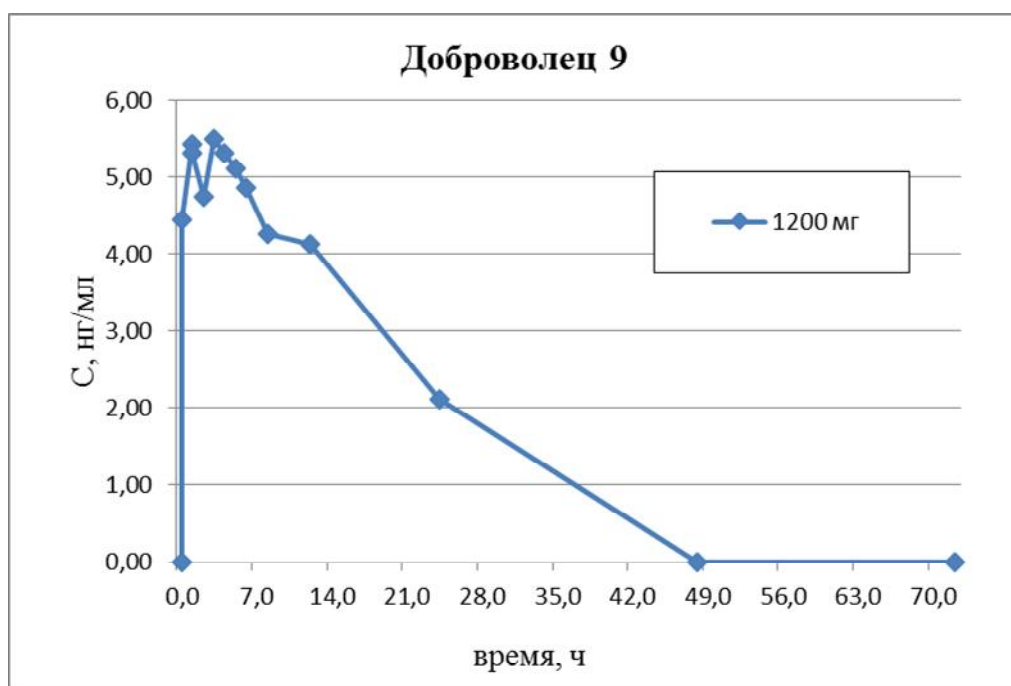


Рисунок 52. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 9, 1200 мг.

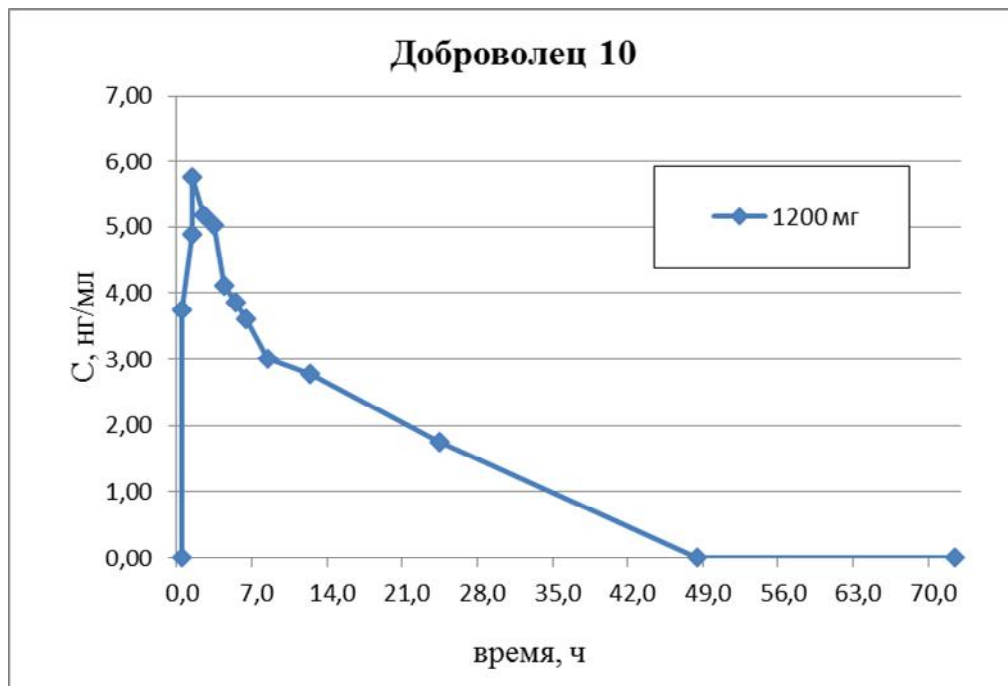


Рисунок 53. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 10, 1200 мг.

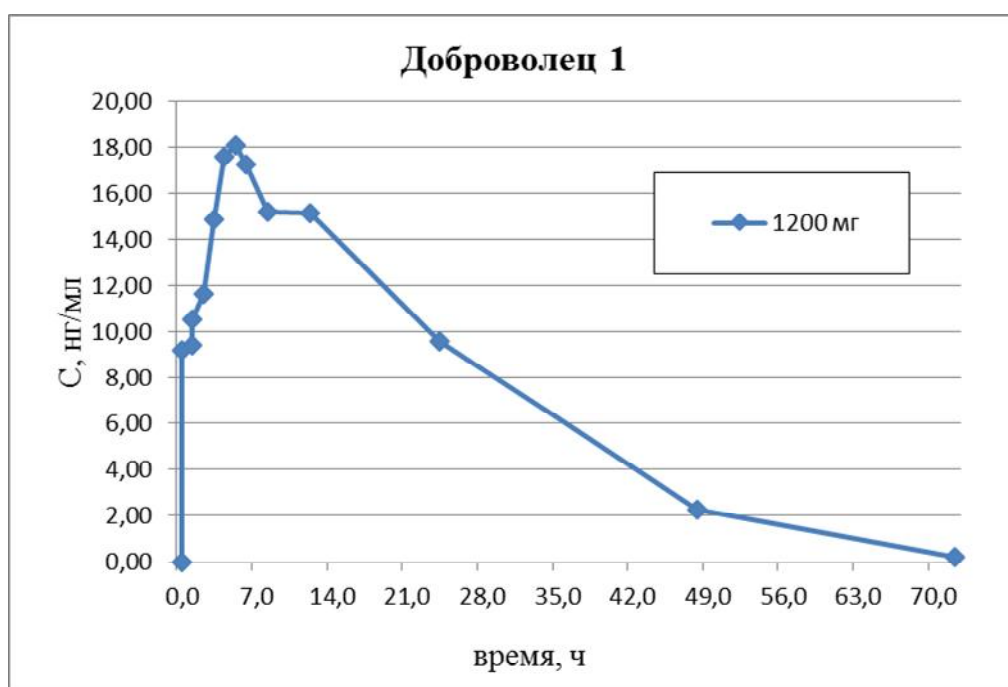
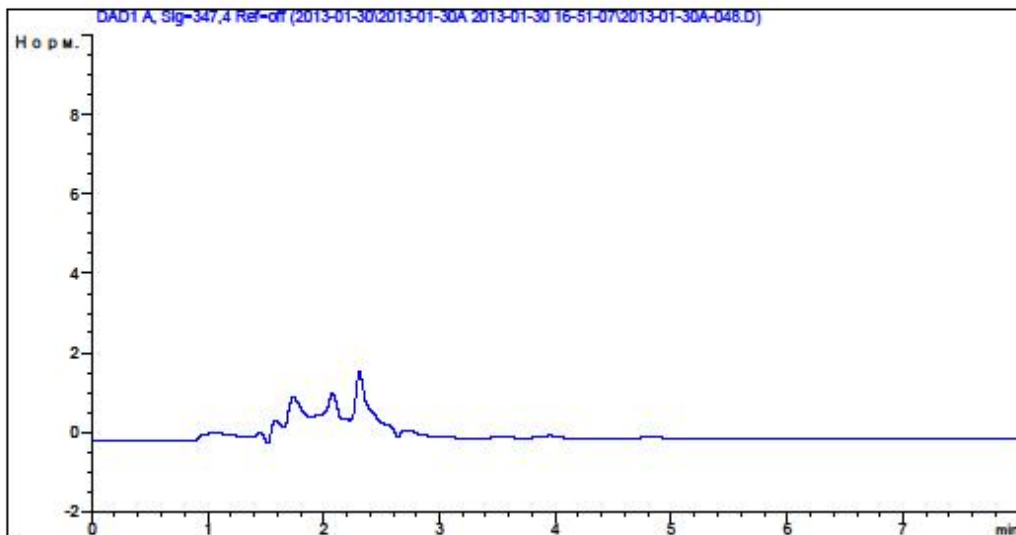


Рисунок 54. Индивидуальный фармакокинетический профиль добровольца 1, 1600 мг.

```

=====
Оператор: Medvedev Y                               Стр. Посл. : 48
Прибор   : Прибор 1                                 Позция   : Вязала 53
Дата Ввода: 31.01.2013 0:31:00                     Ввод    : 1
                                                    Объем   : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (
                    Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:45:59 Medvedev Y
                    (изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
    
```



Отчет Внешний Стандарт

```

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD
    
```

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.369	-	-	-	-	-	perchlozon

Всего : 0.00000

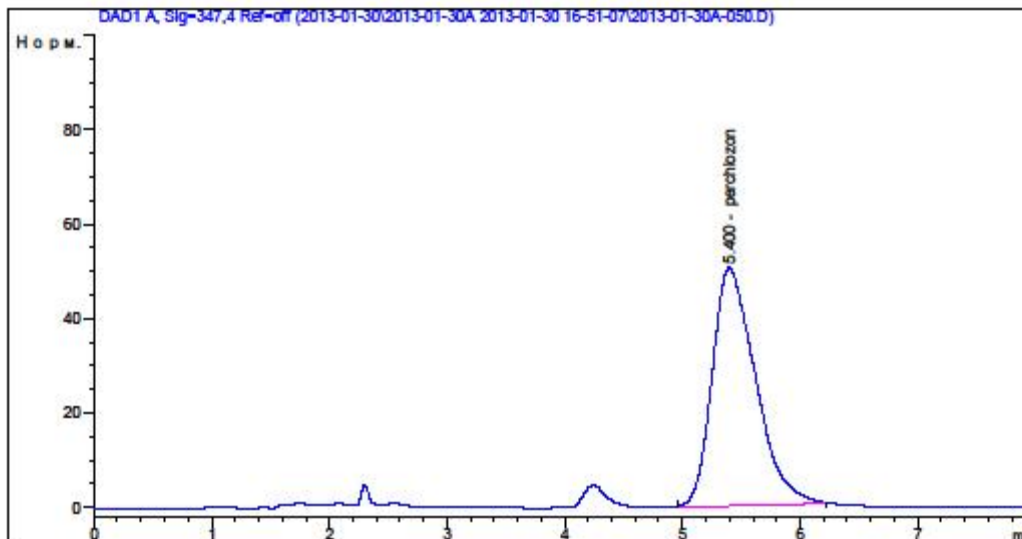
1 Сообщения или Ошибки :

Внимание : Калибруемое соединение не найдено

Рисунок 55. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 0 ч.


```

=====
Оператор: Medvedev Y                      Стр. Посл. : 50
Прибор   : Прибор 1                      Позиция : Вialа 55
Дата Ввода: 31.01.2013 0:50:32           Ввод : 1
                                           Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (
                    Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:01 Medvedev Y
                    (изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
    
```



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

```

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD
    
```

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

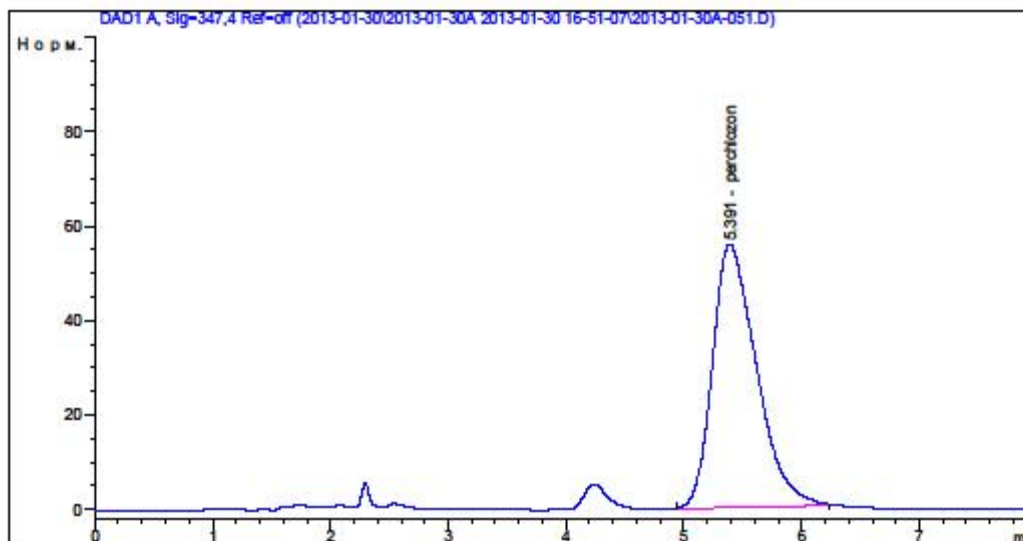
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.400	ВВ	1286.57031	7.32905e-3	9.42933		perchlozon

Всего : 9.42933

*** Конец Отчета ***

Рисунок 57. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 1 ч.

=====
Оператор: Medvedev Y Стр. Посл. : 51
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вiala 56
Дата Ввода: 31.01.2013 1:00:17 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:01 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
=====



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.391	BB	1440.19958	7.32146e-3	10.54437		perchlozon

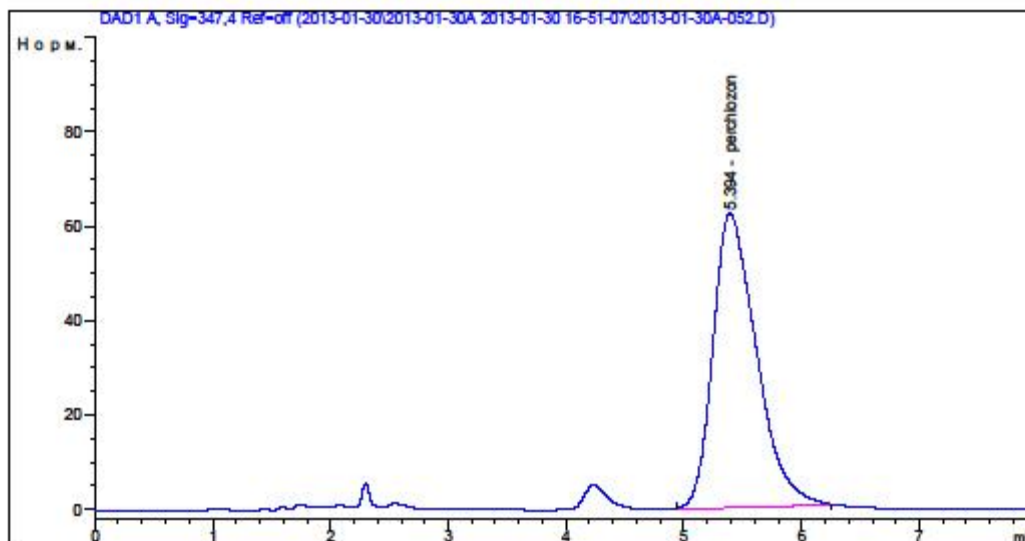
Всего : 10.54437

=====
*** Конец Отчета ***
=====

Рисунок 58. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 1,5 ч.

```

=====
Оператор: Medvedev Y                               Стр. Посл. : 52
Прибор   : Прибор 1                                 Position : Висла 57
Дата Ввода: 31.01.2013 1:10:03                     Ввод : 1
                                                    Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (
                    Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:01 Medvedev Y
                    (изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
    
```



=====
 Отчет Внешний Стандарт
 =====

```

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD
    
```

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

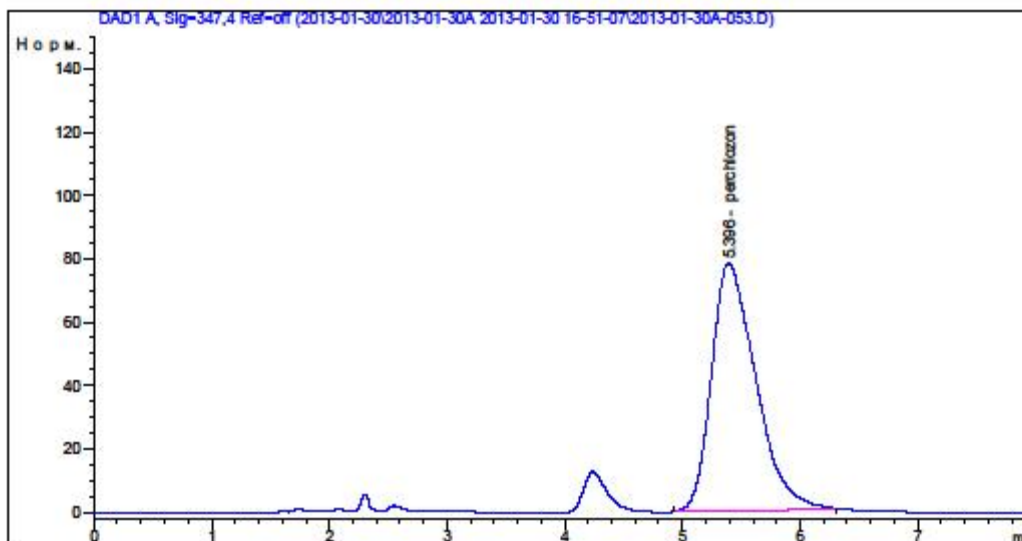
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.394	BB	1594.52417	7.31532e-3	11.66445		perchlozon

Всего : 11.66445

=====
 *** Конец Отчета ***

Рисунок 59. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 2 ч.

=====
Оператор: Medvedev Y Стр. Посл. : 53
Прибор : Прибор 1 Позиция : Биала 58
Дата Ввода: 31.01.2013 1:19:49 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:43 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
=====



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

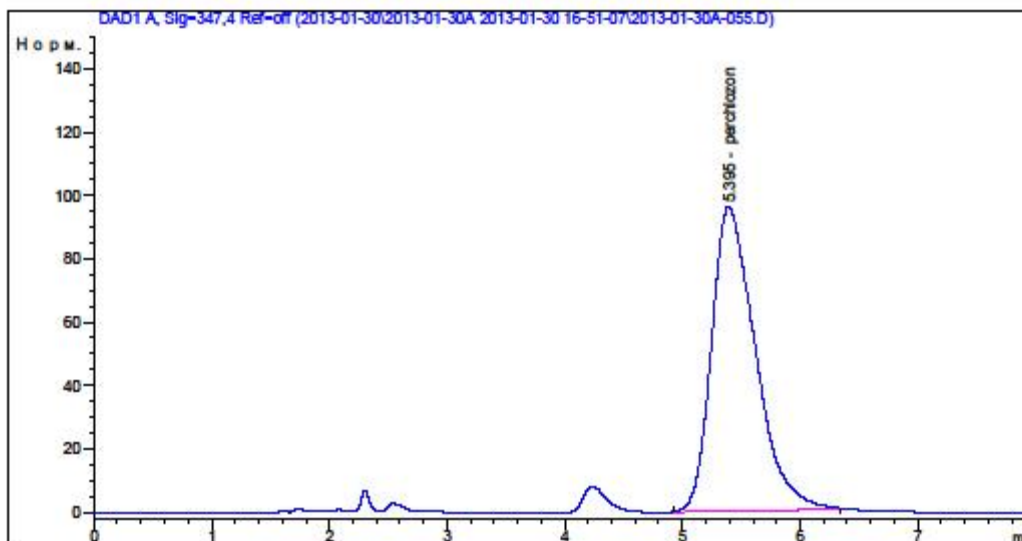
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.396	BB	2038.67908	7.30282e-3	14.88812		perchlozon

Всего : 14.88812

=====
*** Конец Отчета ***
=====

Рисунок 60. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 3 ч.

=====
Оператор: Medvedev Y Стр. Посл. : 55
Прибор : Прибор 1 Позиция : Биала 60
Дата Ввода: 31.01.2013 1:39:20 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:43 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
=====



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.395	BB	2479.20093	7.29485e-3	18.08541		perchlozon

Всего : 18.08541

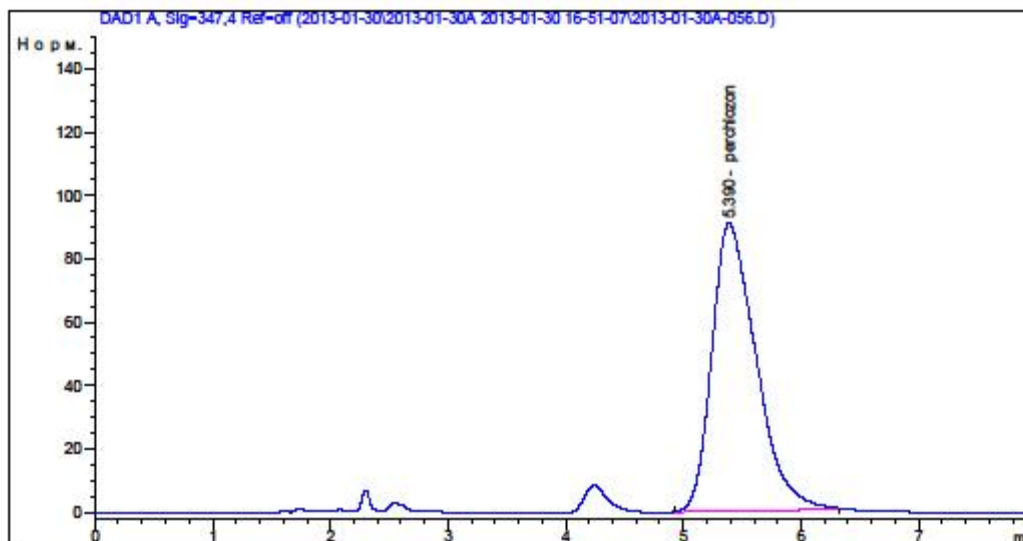
=====
*** Конец Отчета ***
=====

Рисунок 62. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 5 ч.

```

=====
Оператор: Medvedev Y                               Стр. Посл. :   56
Прибор   : Прибор 1                               Позиция : Вiala 61
Дата Ввода: 31.01.2013 1:49:04                   Ввод : 1
                                                Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (
                    Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:43 Medvedev Y
                    (изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
=====

```



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

```

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

```

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

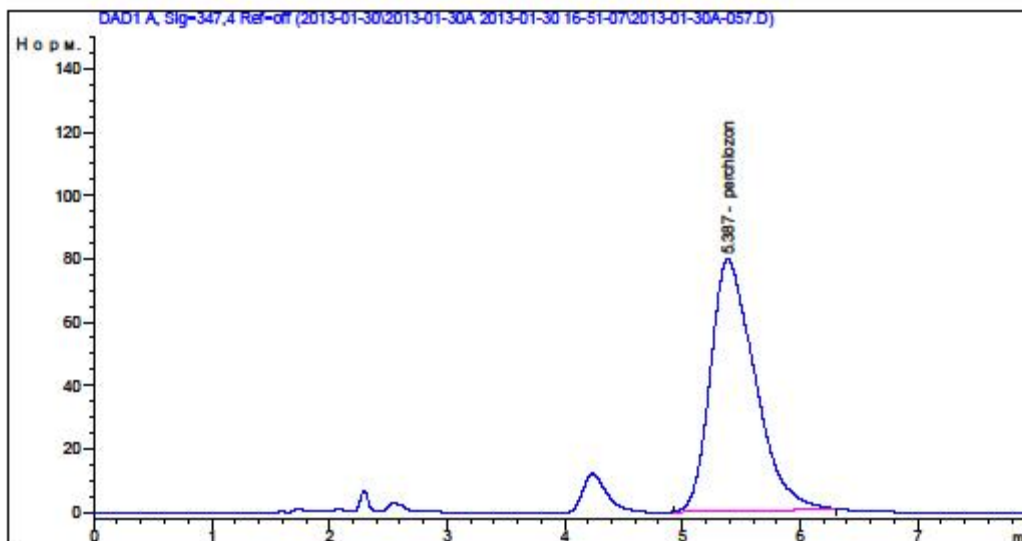
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл. [мкг/мл]	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.390	ВВ	2366.45435	7.29661e-3	17.26710		perchlozon

Всего : 17.26710

*** Конец Отчета ***

Рисунок 63. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 6 ч.

=====
Оператор: Medvedev Y Стр. Посл. : 57
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вiala 62
Дата Ввода: 31.01.2013 1:58:50 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:43 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
=====



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.387	ВВ	2081.19238	7.30191e-3	15.19668		perchlozon

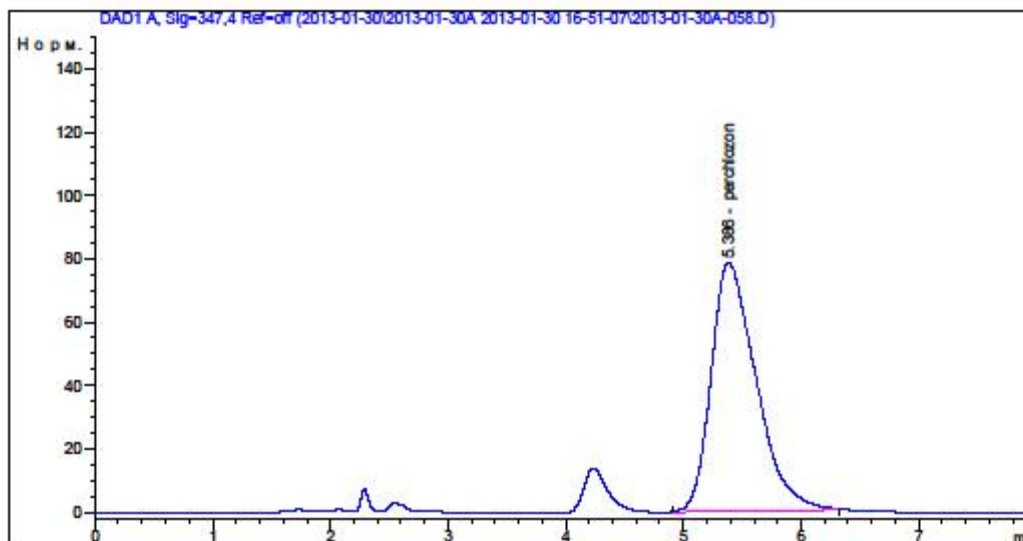
Всего : 15.19668

=====
*** Конец Отчета ***
=====

Рисунок 64. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 8 ч.

```

=====
Оператор: Medvedev Y                               Стр. Посл. :   58
Прибор   : Прибор 1                               Position : Висла 63
Дата Ввода: 31.01.2013 2:08:36                   Ввод    :   1
                                                Объем   : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (
                    Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:48:43 Medvedev Y
                    (изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
    
```



Отчет Внешний Стандарт

```

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD
    
```

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

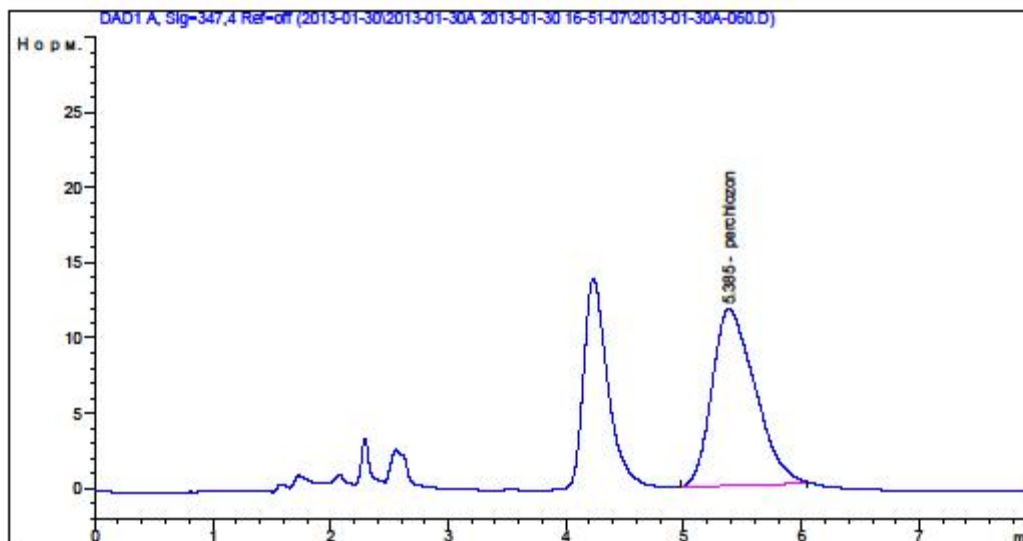
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.386	ВВ	2073.80322	7.30206e-3	15.14305		perchlozon

Всего : 15.14305

*** Конец Отчета ***

Рисунок 65. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 12 ч.

=====
Оператор: Medvedev Y Стр. Посл. : 60
Прибор : Прибор 1 Позиция : Биала 65
Дата Ввода: 31.01.2013 2:28:08 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:49:55 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN
=====



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.385	BB	297.42212	7.56543e-3	2.25013		perchlozon

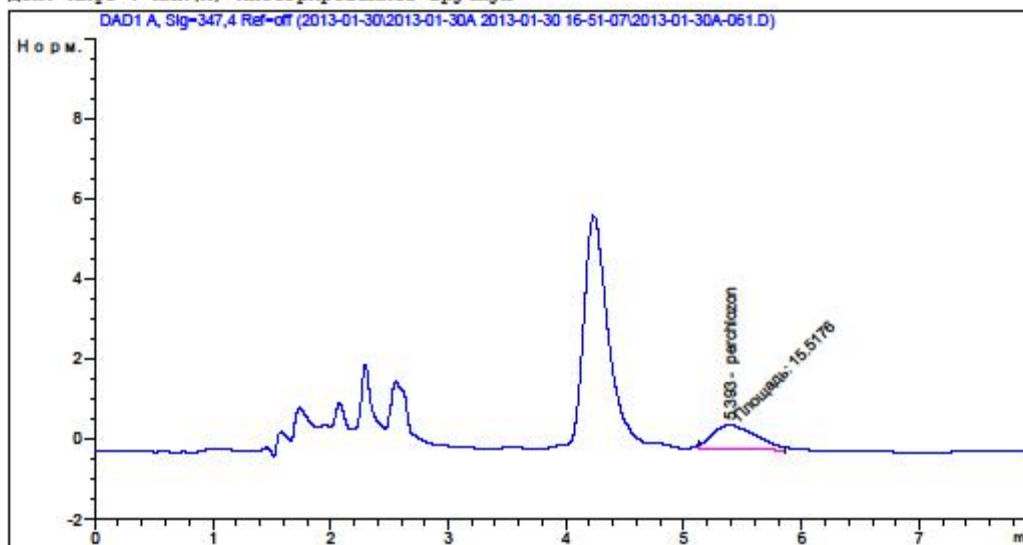
Всего : 2.25013

=====
*** Конец Отчета ***

Рисунок 67. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 48 ч.

=====
Оператор: Medvedev Y Стр. Посл. : 61
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вiala 66
Дата Ввода: 31.01.2013 2:37:54 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 29.01.2013 15:55:56 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-30\2013-01-30A 2013-01-30 16-51-07\PERCHLOZON.M (Метод Послед..сти)
Последние изменения: 31.01.2013 11:50:09 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
Сведения о Методе: 85 buffer /15 ACN

Доп. Инфо : Пик(и) интегрировались вручную



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 31 Января 2013 г. 11:31:35
Множитель: : 1.0000
Разбавление: : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*s]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.393	MM	15.51759	1.31511e-2	2.04073e-1		perchlozon

Всего : 2.04073e-1

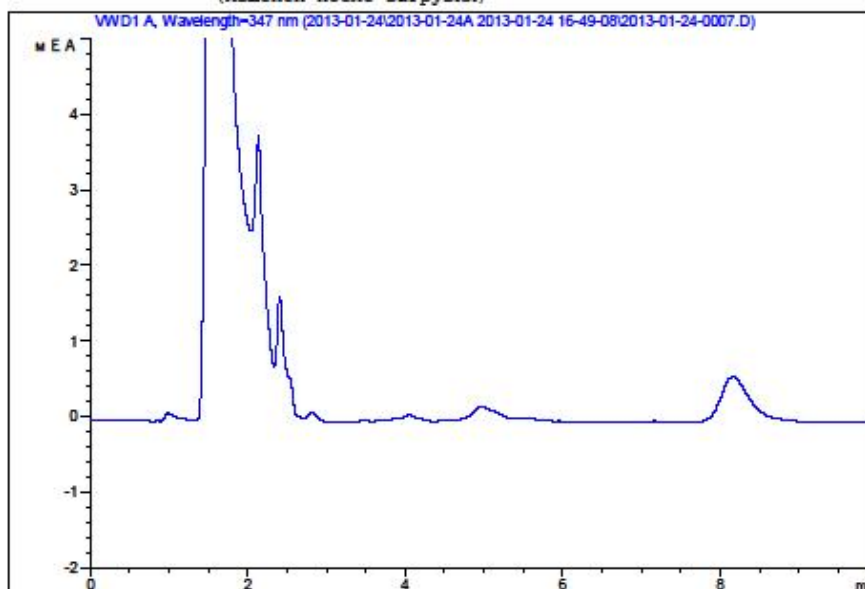
=====
*** Конец Отчета ***

Рисунок 68. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 1600 мг. Время после приёма препарата – 72 ч.

=====

Оператор: Стр. Посл. : 7
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 11
Дата Ввода: 24.01.2013 18:00:11 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl

Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:26:18 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: WVD1 A, Wavelength=347 nm

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*s]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Групп	Имя
5.221	-	-	-	-	-	perchlozon

Всего : 0.00000

1 Сообщения или Ошибки :

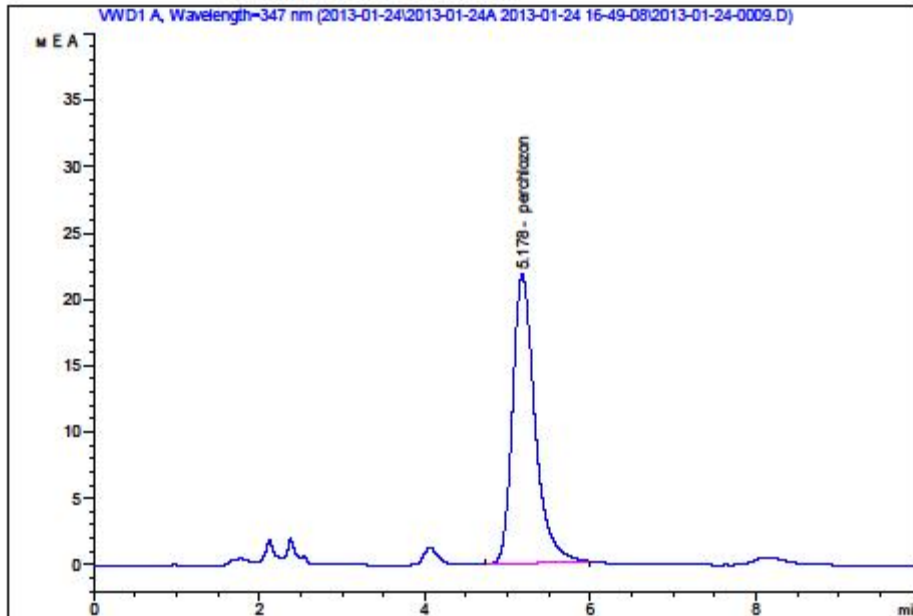
Внимание : Калибруемое соединение не найдено

Рисунок 69. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 0 ч.

=====

Оператор: Стр. Посл. : 9
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 13
Дата Ввода: 24.01.2013 18:23:21 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl

Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:27:23 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель: : 1.0000
Разбавление: : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: VWD1 A, Wavelength=347 nm

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.178	BVA	407.80356	7.12095e-3	2.90395		perchlozon

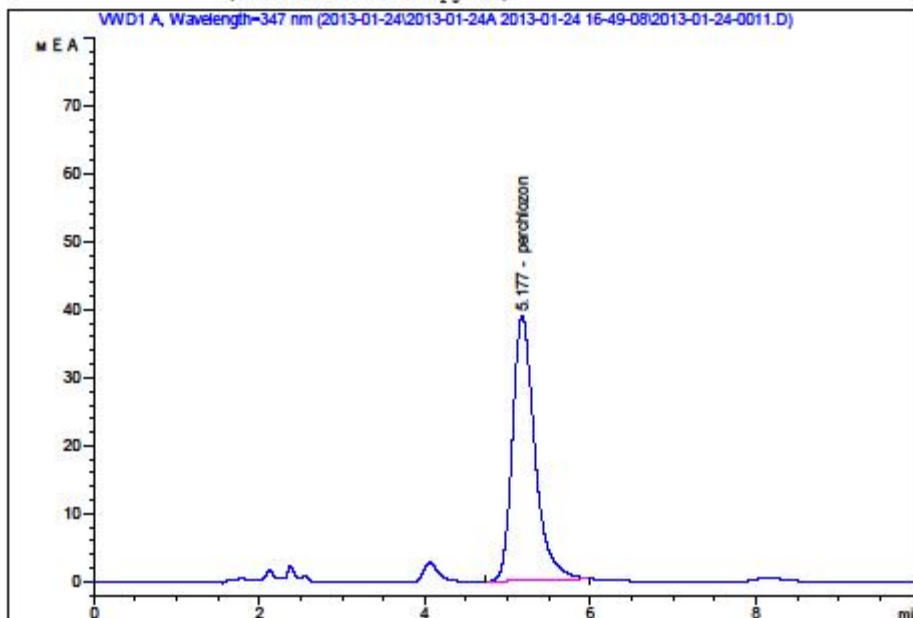
Всего : 2.90395

=====

*** Конец Отчета ***

Рисунок 70. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 1 ч.

Оператор: Стр. Посл. : 11
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 15
Дата Ввода: 24.01.2013 18:46:31 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:28:00 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



Отчет Внешний Стандарт

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: VWD1 A, Wavelength=347 nm

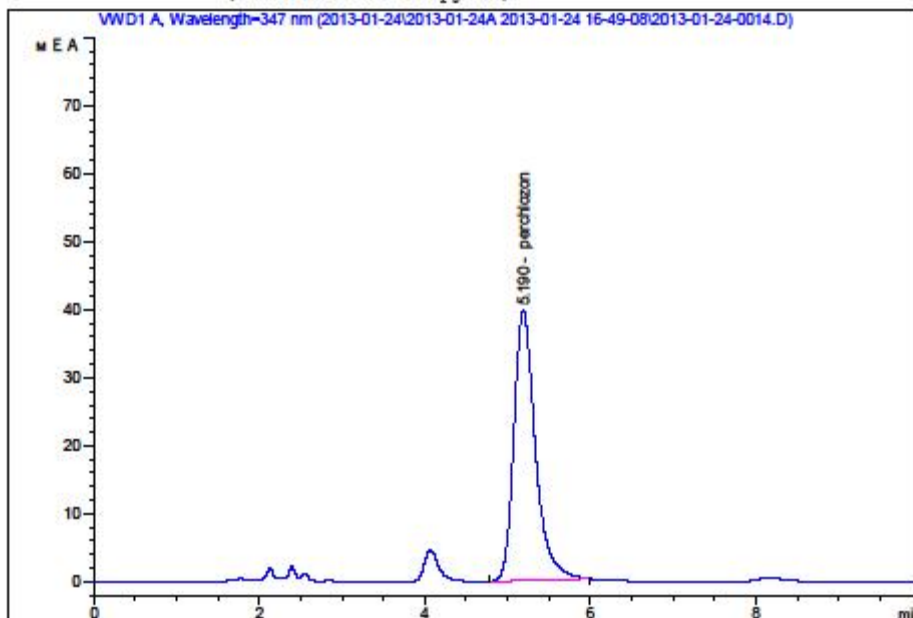
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.177	BVA	726.72748	6.90364e-3	5.01707		perchloron

Всего : 5.01707

*** Конец Отчета ***

Рисунок 71. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлорона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 2 ч.

Оператор: Стр. Посл. : 14
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 18
Дата Ввода: 24.01.2013 19:21:21 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:28:00 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



Отчет Внешний Стандарт

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель: : 1.0000
Разбавление: : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: VWD1 A, Wavelength=347 nm

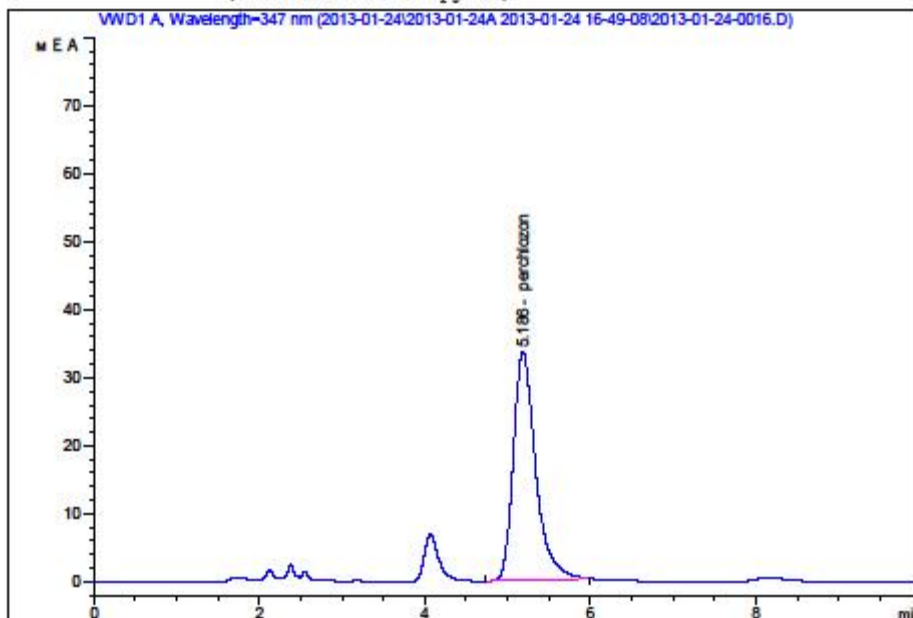
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.190	BVA	713.70209	6.90872e-3	4.93076		perchlozon

Всего : 4.93076

*** Конец Отчета ***

Рисунок 72. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 4 ч.

Оператор: Стр. Посл. : 16
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 20
Дата Ввода: 24.01.2013 19:44:35 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:28:00 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



Отчет Внешний Стандарт

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель: : 1.0000
Разбавление: : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: VWD1 A, Wavelength=347 nm

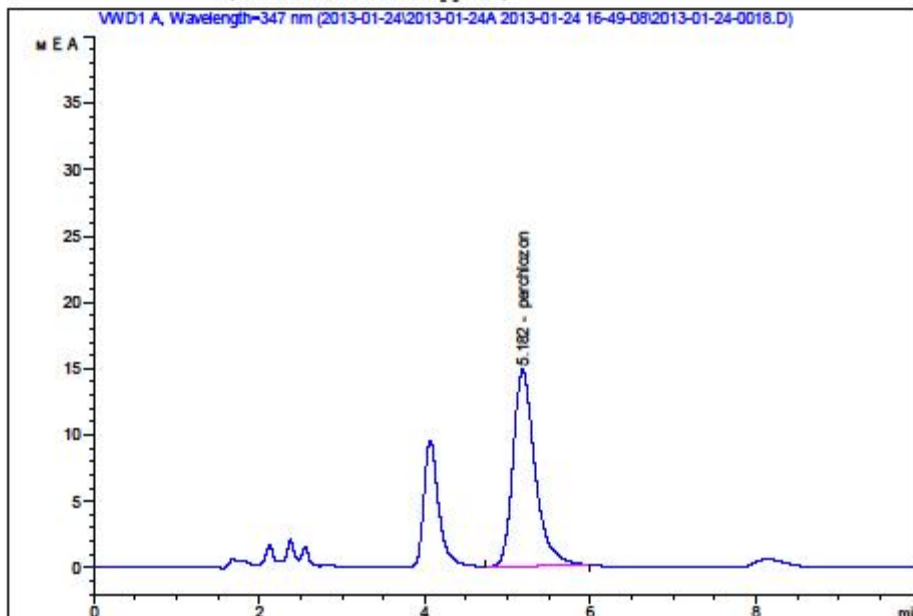
RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.186	BBA	626.99274	6.94784e-3	4.35625		perchlozon

Всего : 4.35625

*** Конец Отчета ***

Рисунок 73. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата 6 ч.

=====
Оператор: Стр. Посл. : 18
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 22
Дата Ввода: 24.01.2013 20:07:44 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:29:16 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



=====
Отчет Внешний Стандарт
=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: VWD1 A, Wavelength=347 nm

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*s]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/ml]	Грп	Имя
5.182	BVA	273.14633	7.36506e-3	2.01174		perchlozon

Всего : 2.01174

=====
*** Конец Отчета ***

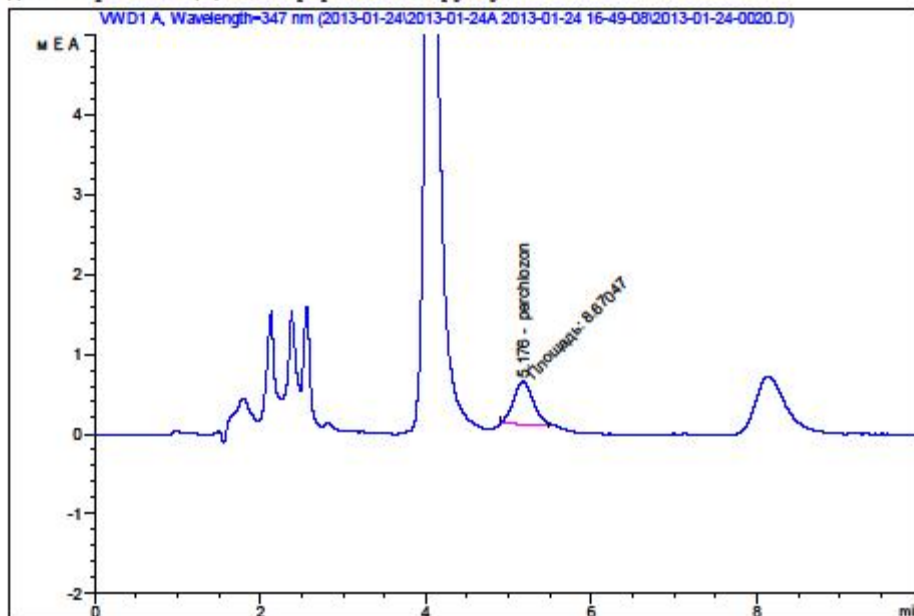
сунок 74. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 12 ч.

=====

Оператор: Стр. Посл. : 20
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 24
Дата Ввода: 24.01.2013 20:30:54 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl

Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:29:52 Medvedev Y
(изменен после загрузки)

Доп. Инфо : Пик(и) интегрировались вручную



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель: : 1.0000
Разбавление: : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: VWD1 A, Wavelength=347 nm

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*s]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.176	MM	8.67047	2.99153e-2	2.59380e-1		perchlozon

Всего : 2.59380e-1

=====

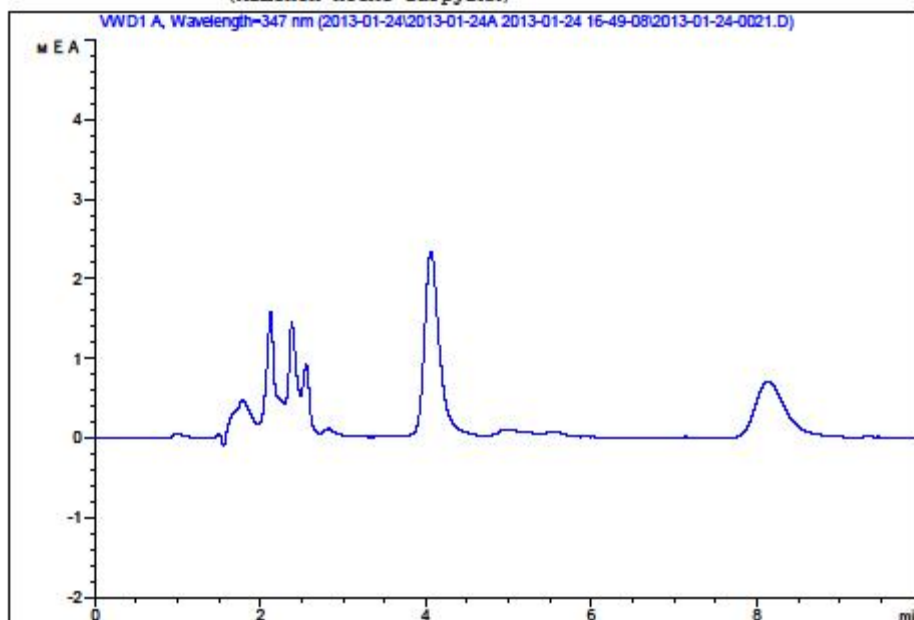
*** Конец Отчета ***

Рисунок 75. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 48 ч.

=====

Оператор: Стр. Посл. : 21
Прибор : Прибор 1 Позиция : Вials 25
Дата Ввода: 24.01.2013 20:42:29 Ввод : 1
Объем : 50.000 µl

Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-49-08\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 24.01.2013 15:40:59
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-24\2013-01-24A 2013-01-24 16-38-30\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 25.01.2013 16:29:52 Medvedev Y
(изменен после загрузки)



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 25 Января 2013 г. 16:09:44
Множитель: : 1.0000
Разбавление: : 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: WWD1 A, Wavelength=347 nm

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мEA*с]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.221	-	-	-	-	-	perchlozon

Всего : 0.00000

1 Сообщения или Ошибки :

Внимание : Калибруемое соединение не найдено

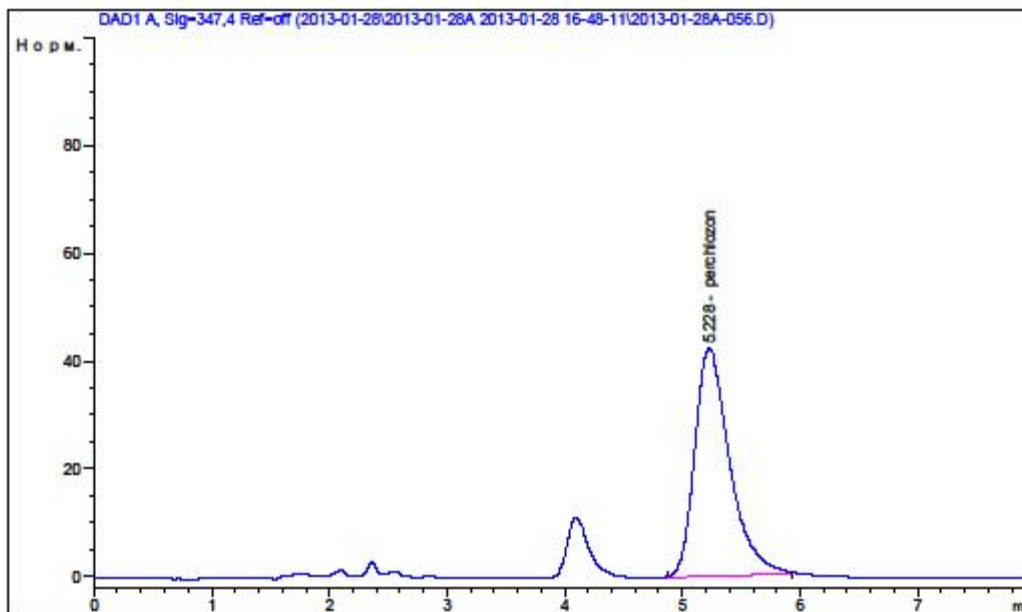
Рисунок 76. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 400 мг. Время после приёма препарата – 72 ч.

=====

Оператор: Medvedev Y	Стр. Посл. : 56
Прибор : Прибор 1	Позиция : Вials 61
Дата Ввода: 29.01.2013 1:44:49	Ввод : 1
	Объем : 50.000 µl

Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-28\2013-01-28A 2013-01-28 16-48-11\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 28.01.2013 16:07:41 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-28\2013-01-28A 2013-01-28 16-48-11\PERCHLOZON.M (Метод Послед.сти)
Последние изменения: 29.01.2013 17:45:13 Medvedev Y
(изменен после загрузки)

=====



=====

Отчет Внешний Стандарт

=====

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 29.01.2013 17:34:36
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применить Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*s]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/ml]	Грп	Имя
5.228	ВВ	866.52850	7.02955e-3	6.09131		perchlozon

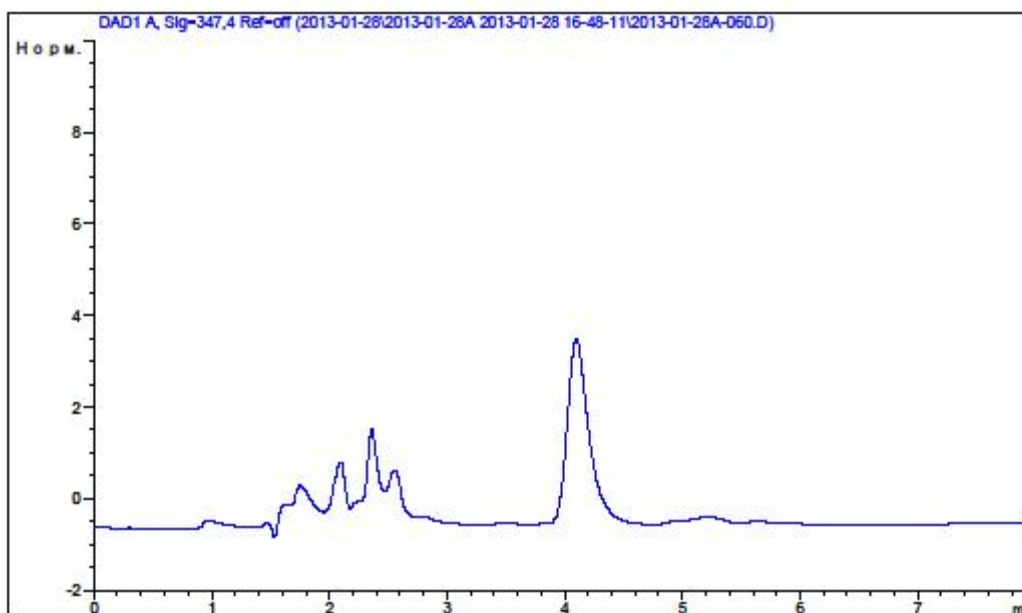
Всего : 6.09131

=====

Рисунок 80. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлозона в дозе 800 мг. Время после приёма препарата – 6 ч.


```

=====
Оператор: Medvedev Y                               Стр. Посл. : 60
Прибор   : Прибор 1                               Позиция : Вials 65
Дата Ввода: 29.01.2013 2:23:45                   Ввод    : 1
                                                Объем   : 50.000 µl
Метод сбора Данных: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-28\2013-01-28A 2013-01-28 16-48-11\PERCHLOZON.M
Последние изменения: 28.01.2013 16:07:41 Medvedev Y
Метод обработки: C:\CHEM32\1\DATA\2013-01-28\2013-01-28A 2013-01-28 16-48-11\PERCHLOZON.M (
Метод Послед..сти)
Последние изменения: 29.01.2013 17:46:49 Medvedev Y
(изменен после загрузки)
=====
  
```



Отчет Внешний Стандарт

```

Сортировка : Сигнал
Калиб. Данные Изменены: 29.01.2013 17:34:36
Множитель : 1.0000
Разбавление : 1.0000
Применить Множитель & Разбавление к ISTD
  
```

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=347,4 Ref=off

RetTime [мин]	Тип	Площадь [мЕА*s]	Сод./Пл.	Содерж. [мкг/мл]	Грп	Имя
5.119	-	-	-	-	-	perchlozon

Всего : 0.00000

1 Сообщения или Ошибки :

Рисунок 82. Хроматограмма плазмы крови добровольца после однократного приёма перхлорона в дозе 800 мг. Время после приёма препарата – 48 ч.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании научного анализа данных о свойствах перхлозона в качестве метода его количественного определения в плазме крови был выбран метод ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.
2. Разработана методика определения инновационного противотуберкулёзного препарата «Перхлозон» в плазме крови человека методом ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (аналитический диапазон методики составил 0,2 – 20 мкг/мл; $r^2 > 0,998$).
3. Проведена валидация разработанной методики определения перхлозона в плазме крови с учётом требований руководств по валидации биоаналитических методик FDA и EMA. Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15 % - для остальных двух концентраций).
4. Осуществлён межлабораторный перенос разработанной методики определения инновационного противотуберкулёзного препарата «Перхлозон» в плазме крови человека с хроматографической системы Waters Alliance 2695 на хроматографическую систему Agilent 1260. Проведена частичная валидация методики в ходе переноса. Показано, что разработанная методика может быть быстро перенесена на другую хроматографическую систему, при сохранении условий ВЭЖХ разделения.
5. Определены и изучены фармакокинетические параметры перхлозона у здоровых лиц после однократного перорального приема: C_{\max}

перхлозона составила $4,49 \pm 0,95$ мкг/мл; $7,03 \pm 1,00$ мкг/мл; $9,64 \pm 2,10$ мкг/мл для дозировок 400 мг, 800 мг и 1200 мг, соответственно. T_{\max} – 1,25 ч для дозировок 400 мг и 800 мг; 2,55 ч для дозировки 1200 мг. AUC_{0-72} перхлозона составила $50,62 \pm 10,98$ мкг*ч/мл; $88,04 \pm 9,28$ мкг*ч/мл; $184,7 \pm 41,35$ мкг*ч/мл для дозировок 400 мг, 800 мг и 1200 мг, соответственно. $T_{1/2}$ перхлозона составил около 9 – 12 ч, MRT – около 11-16 ч. Отмечено, что динамика концентрации перхлозона в крови испытуемых характеризуется умеренным разбросом (CV около 30-40 % для C_{\max}).

6. Показана возможность применения разработанной методики определения перхлозона в плазме крови человека для проведения терапевтического мониторинга на фоне курсового лечения перхлозоном в сочетании с другими противотуберкулёзными препаратами. Равновесная концентрация в плазме составила от 1,98 мкг/мл до 3,45 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Перельман М.И., Корякин В.А., Богадельникова И.В. Фтизиатрия. М.: Медицина, 2006. 519 с.
2. Туберкулёз в Российской Федерации 2011 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире / Л.А. Габбасова [и др.]. М.: 2013. 280 с.
3. Скачкова Е.И., Нечаева О.Б., Пунга В.В. Организация противотуберкулезной помощи в России // Социальные аспекты здоровья населения. 2008 Т. 4, №2. С 1-7.
4. Мишин В.Ю. Лечение больных туберкулёзом лёгких: Учеб. Метод. Пособие для врачей. М.: МГМСУ, 2006.
5. Приказ МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 года. “О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации”. М.; 2003.
6. Химиотерапия при туберкулезе легких: Методические указания МЗ СССР. М.; 1963.
7. Химиотерапия больных туберкулезом легких: Методические рекомендации МЗ СССР. М.; 1983.
8. Хоменко А.Г., Чуканов В.И., Мишин В.Ю. и др. Эффективность применения офлоксацина в комплексном лечении больных туберкулезом легких, осложненным неспецифической бронхолегочной инфекцией. Новые лекарств. препараты. 1995; 11: 13–20.
9. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью: Пер. с англ. / Ред. И. Бастиан, Ф.Порталс М.: Медицина и жизнь, 2003. - 368 с.
10. Harkin T.I., Harris H. W. Treatment of the multidrug-resistant tuberculosis // Tuberculosis. - 1996.-P. 843-850.

11. Iseman M.D., Cohn D.L., Swarbaro J.A. Directly observed treatment of tuberculosis//N. Engl. J. Med. -1993. -Vol.328. - № 8, - P.576- 578.
12. Е.Н. Стрельцова, Н.А. Степанова. Спектр лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* у больных туберкулезом легких // Астраханский медицинский журнал. 2009. Т. 4, №2. С 25-30.
13. Репин Ю.М. Современное состояние фтизиохирургии // Туберкулез: проблемы диагностики, лечения и профилактики. Новая волна, 2003. 528 с. 157.
14. Соколова Г. Б. и др. Разработка современных протоколов диагностики и лечения туберкулёза органов дыхания // Consilium medicum. – 2001. – т. 3, № 3. – с. 148-154.
15. Федеральный закон №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Принят постановлением Правительства Российской Федерации от 12.04.2010.
16. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. E6 (R1) « Guideline for good clinical practice». – ICH, Geneva, 1996.
17. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика». – М., 2005.
18. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. E9 « Statistical principles for clinical trials». – ICH, Geneva, 1998.
19. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. E8 « General considerations for clinical trials». – ICH, Geneva, 1997.
20. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2006.
21. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика (руководство). М.: Медицина, 1980, 423 с.

22. Методические Указания Минздравсоцразвития Российской Федерации «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» – М., 2008 г.
23. Методические Указания «Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств» – М., 2004
24. А.В. Соколов. Правила исследования биоэквивалентности лекарств // Клиническая фармакокинетика. 2004. №1. С. 5-13.
25. Рейхарт Д.В., Чистяков В.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях // Казанский медицинский журнал. 2010. Т. 91. № 4. С. 532-536.
26. Медведев Ю.В., Раменская Г.В., Шохин И.Е., Ярушок Т.А. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2013. Т. 47. № 4. С. 45-51.
27. Stephane Pirnay, Stephane Bouchonnet, Françoise Hervé, Danielle Libong, Nathalie Milan, Philippe d'Athis, Frédéric Baud, Ivan Ricordel. Development and validation of a gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of buprenorphine, flunitrazepam and their metabolites in rat plasma: application to the pharmacokinetic study // Journal of Chromatography B. 2004. Vol. 807, Issue 2. P. 335-342.
28. Maria Tóth, Andrea Bereczki, Sándor Drabant, Katalin Balogh Nemes, Bálint Varga, Gyula Grézal, Judit Tömlő, Géza Lakner, Imre Klebovich. Gas chromatography nitrogen phosphorous detection (GC-NPD) assay of tofisopam in human plasma for pharmacokinetic evaluation // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006. Vol. 41, Issue . P. 1354-1359.
29. Ming Xue, Shulan Yuan, Jinxiu Ruan, Jianzhong Qiao, Yanxia Xu, Zhenqin Zhang, Keliang Liu. Determination of penehyclidine by gas chromatographic–mass spectrometry and its application

- to pharmacokinetics in humans, rabbits and mice // *Journal of Chromatography B*. 2006. Vol. 843, Issue 2. P. 234-239.
30. Susana Torrado, Jordi Segura, Magí Farré, Rosa Ventura. Gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of 19-nor-4-androstenediol and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic studies after oral administration of a prohormone supplement // *Steroids*. 2008. Vol. 73, Issue 7. P. 751-759.
 31. E. Muntoni, R. Canaparo, C. Della Pepa, L. Serpe, F. Casale, S. Barbera, P. Romano, G.P. Zara, M. Eandi. Determination of disodium clodronate in human plasma and urine using gas-chromatography–nitrogen-phosphorous detections: validation and application in pharmacokinetic study // *Journal of Chromatography B*. 2004 Vol. 799, Issue 1. P. 133-139.
 32. J. Pastera, L. Mejstříková, J. Zoulová, K. Macek, J. Květina. Simultaneous determination of nitrendipine and one of its metabolites in plasma samples by gas chromatography with electron-capture detection // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007. Vol. 44, Issue 3. P. 674-679.
 33. M. Depot, S. Leroux, G. Caille. High-resolution liquid chromatographic method using ultraviolet detection for determination of ondansetron in human plasma // *Journal of Chromatography B*. 1997. Vol. 693. P. 399–406.
 34. L. Zufia, A. Aldaz, J. Garildez. Simple determination of capecitabine and its metabolites by liquid chromatography with ultraviolet detection in a single injection // *Journal of Chromatography B*. 2004. Vol. 809. P. 51–58.
 35. H. Kim, P. Likhari, D. Parker et al. High-performance liquid chromatographic analysis and stability of anti-tumor agent temozolomide in human plasma // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001. Vol. 24. P. 461–468.
 36. G. Bahrami, B. Mohammadi, S. Mirzaeei et al. Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography

- with UV detection // *Journal of Chromatography B*. 2005. Vol. 826. P. 41–45.
37. R. M.W. Hoetelmans, M. Essenberg, M. Profijt et al. High-performance liquid chromatographic determination of ritonavir in human plasma, cerebrospinal fluid and saliva. // *Journal of Chromatography B*. 1998. Vol. 705. P.119–126.
 38. L. Goldwirt, S. Chhun, E. Rey et al. Quantification of darunavir (TMC114) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *Journal of Chromatography B*. 2007. Vol. 857. P. 327–331.
 39. N. Widmer, A. Beguin, B. Rochat et al. Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection // *Journal of Chromatography B*. 2004. Vol. 803. P. 285–292.
 40. B. Fan, J. T. Stewart. Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002. Vol. 28. P. 903–908.
 41. A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati et al. Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003. Vol. 31. P. 197-200.
 42. R. F. Suckow, M. F. Zhang, E. D. Collins et al. Sensitive and selective liquid chromatographic assay of memantine in plasma with fluorescence detection after pre-column derivatization // *Journal of Chromatography B*. 1999. Vol. 729. P. 217–224.
 43. Gh. Bahrami, Sh. Mirzaeei, A. Kiani. Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies// *Journal of Chromatography B*. 2004. Vol. 813. P. 175–180.

44. Rolf W. Sparidans, Richard M.W. Hoetelmans, Jos H. Beijnen. Liquid chromatographic assay for simultaneous determination of abacavir and mycophenolic acid in human plasma using dual spectrophotometric detection// *Journal of Chromatography B*. 2001. Vol. 750. P. 155–161.
45. N. Perrottet, A. Beguin, P. Meylan et al. Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography–spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples// *Journal of Chromatography B*. 2007. Vol. 852. P. 420–429.
46. Heewon Lee. Pharmaceutical Applications of Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (LC/MS) // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005. Vol. 28. № 7-8. P. 1161-1202.
47. L. Ding, L. Yang, F. Liu et al. A sensitive LC–ESI-MS method for the determination of indapamide in human plasma: Method and clinical applications// *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. Vol. 42. P. 213–217.
48. F. N. Bazotia, E. Gikasb, A. Skoutelisc et al. Development and validation of an ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of daptomycin in human plasma// *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. Vol. 56. P. 78– 85.
49. B. Cabovska, S. L. Cox, A. A. Vinks. Determination of risperidone and enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in plasma by LC-MS/MS // *Journal of Chromatography B*. 2007. Vol. 852. P. 497–504.
50. G. Brandhorst, F. Streit, S. Goetze et al. Quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry of mycophenolic acid and its phenol and acyl glucuronide metabolites // *Clinical Chemistry*. 2006. Vol. 52, No. 10. P. 1962-1964

51. LC–MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma / Oskar Gonzalez et al. // *Journal of Chromatography B*. 2010. № 878. P. 2685–2692.
52. Development of an LC–MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy / Oskar Gonzalez et al. // *Journal of Chromatography B*. 2011. № 879. P. 243–252.
53. Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Qi Gu et al. // *Journal of Chromatography B*. 2004. № 813. P. 337-342
54. Joanne E. Adaway, Brian G. Keevil. Therapeutic drug monitoring and LC–MS/MS // *Journal of Chromatography B*. 2012. Vol. 883–884. P. 33-49.
55. Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study / Dan Wang et al. // *Journal of Chromatography B*. № 879. 2011. P. 1827– 1832.
56. Maurice Wermeille, Etienne Moreta, Jean-Pascal Siest et al. The determination of dimethindene in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1993. Vol. 11, Issue 7. P. 619-623.
57. Yanhua Zhang, Dawn Dufield, Jon Klover et al. Development and validation of an LC–MS/MS method for quantification of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) in clinical applications: A comparison with a EIA method // *Journal of Chromatography B*. 2009. Vol. 877, Issues 5–6. P. 513-520.
58. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.

59. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011.
60. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2A «Text on Validation of Analytical Procedures». – ICH, Geneva, 1995.
61. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B «Validation of Analytical Procedures: Methodology». – ICH, Geneva, 1997.
62. Государственный стандарт качества лекарственного средства ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик». – М., 2009 г.
63. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). Под ред. Юргеля Н.В., Младенцева А.Л. Разработано АРФП. – 2007.
64. Методические Указания Минздравсоцразвития Российской Федерации «Методические рекомендации по изучению биоэквивалентности» – М., 2012 г.
65. Государственный стандарт Республики Беларусь СТБ 1436-2004 «Производство лекарственных средств валидация методик испытаний». – Минск, 2004,
66. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К, 2013. — 328 с.
67. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том II. — М.: Гриф и К, 2013. — 280 с.
68. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Савченко А.Ю. и др. Обзор требований к валидации биоаналитических методик // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2011. № 12. С. 60-67.
69. Пресс-релиз ОАО «Фармасинтез». URL:<http://pharmasyntez.com/node/129>. Проверено 11.09.2013.
70. Пресс-релиз ОАО «Фармасинтез». URL:<http://pharmasyntez.com/node/136>. Проверено 11.09.2013.

71. Пресс-релиз ОАО «Фармасинтез». URL: <http://pharmasyntez.com/node/128>. Проверено 11.09.2013.
72. Программное обеспечение ALOGPS 2.1. URL: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>. Проверено 11.09.2013
73. А.М. Власов, Ю.Н. Башкатова, А.Ю. Савченко, М.Р. Хаитов, Г.В. Раменская. Определение перхлорона в плазме крови с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием // Биомедицина. 2011. № 2. С. 73-78.
74. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Техносфера, 2010. 272 с.
75. Van Heeswijk R.P.G., Hoetelmans R.M.W., Meenhorst P.L., Mulder J.W., Beijnen J.H. Rapid determination of nevirapine in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // J. Chromatogr. B. 1998. V. 713. P. 395–399.
76. Marzolini C., Telenti A., Buclin T., Biollaz J., Decosterd L.A. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. // J. Chromatogr. B. 2000. V. 740. P. 43–58.
77. Svensson J.-O., Barkholt L., SaWe J. Determination of acyclovir and its metabolite 9-carboxymethoxymethylguanine in serum and urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. B. 1997. V. 690. P. 363–366.
78. Hosotsubo H., Takahara S., Kokado Y., Permpongkosol S., Wang J.-D., Tanaka T., Matsumiya K., Kitamura M., Okuyama A., Sugimoto H. Rapid and simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide conjugate in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography using isocratic elution. // J. Chromatogr. B. 2001. V. 753. P. 31320.

79. Burger D.M., De Graaff M., Wuis E.W., Koopmans P.P., Hekster Y.A. Determination of indinavir, an HIV-protease inhibitor, in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 703. P. 235–241.
80. Z. Jiang, H. Wang, D.C. Locke. Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection // *Analytica Chimica Acta.* 2002. V. 456, Issue 2. P. 189-192.
81. Jun Dai, Peter W. Carr. Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Chromatography A.* 2005 V. 1072, Issue 2. P. 169-184.
82. Teresa Cecchi. Ion Pairing Chromatography // *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 2008. V. 38, № 3 P. 161-213.
83. Zi Yi Yang, Lin Wang, Xing Tang. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2009. V. 49, Issue 3. P. 811-815.
84. Guowei Dai, Xiaohui Wei, Zhongfa Liu, Shujun Liu, Guido Marcucci, Kenneth K. Chan. Characterization and quantification of Bcl-2 antisense G3139 and metabolites in plasma and urine by ion-pair reversed phase HPLC coupled with electrospray ion-trap mass spectrometry // *Journal of Chromatography B.* 2005. V. 825, Issue 2. P. 201-213.
85. F. Qin, N. Li, T. Qin et al. Simultaneous quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study // *Journal of Chromatography B.* 2010. Vol. 878. P. 689–694.
86. C. Arellano, P. Gandia, T. Lafont et al. Determination of unbound fraction of imatinib and N-desmethyl imatinib, validation of an UPLC–MS/MS assay and ultrafiltration method // *Journal of Chromatography B.* 2010. Vol. 878. P. 689–694.

87. A. Gupta, P. Singhal, P. S. Shrivastav et al. Application of a validated ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of darunavir in human plasma for a bioequivalence study in Indian subjects // *Journal of Chromatography B*. 2011. Vol. 879. P. 2443–2453.
88. S. Cai, T. Huo, W. Feng et al. Quantitative determination of mitiglinide in human plasma by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2008. Vol. 868. P. 83–87.
89. B. Dasandi, S. Shah, Shivprakash. Development and validation of a high throughput and robust LC–MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of diltiazem and its two metabolites in human plasma: Application to a bioequivalence study // *Journal of Chromatography B*. 2009. Vol. 877. P. 791–798.
90. Dong Wang, Dongmei Wang, Feng Qin et al. Determination of lovastatin in human plasma by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Biomedical Chromatography*. 2008. Vol. 22. P. 511–518.
91. Shuyan Yang, Feng Qin, Dan Wang et al. Determination of palonosetron in human plasma by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. Vol. 57 P. 13–18.
92. P. B. Phapale, H. W. Lee, M. Lim et al. Rapid determination of finasteride in human plasma by UPLC–MS/MS and its application to clinical pharmacokinetic study // *Journal of Chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 1718–1723.
93. N. C. Borges, V. M. Rezende, J. M. Santana et al. Chlorpromazine quantification in human plasma by UPLC–electrospray ionization tandem

- mass spectrometry. Application to a comparative pharmacokinetic study // *Journal of Chromatography B*. 2011. Vol. 879. P. 3728– 3734.
94. D. S. Patel, N. Sharma, M. C. Patel et al. Application of a rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of bumetanide in human plasma for a bioequivalence study // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. Vol. 66. P. 365– 370.
 95. P. Proenca, J. M. Franco, C. Musta et al. An UPLC–MS/MS method for the determination of valproic acid in blood of a fatal intoxication case // *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2011. Vol. 18. P. 320-324.
 96. S. Feng, Q. Zhao, J. Jiang et al. Determination of phenylephrine in human plasma using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2013. Vol. 915– 916. P. 28– 32.
 97. Ruiping Li, Lili Dong, Junxiong Huang. Ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma // *Analytica Chimica Acta*. 2005. Vol. 546. P. 167–173.
 98. S. Sentenac, C. Fernandez, A. Thuillier et al. Sensitive determination of tenofovir in human plasma samples using reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Chromatography B*. 2003. Vol. 793. P. 317– 324.
 99. D. P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal et al. Challenges in the simultaneous quantitation of sumatriptan and naproxen in human plasma: Application to a bioequivalence study // *Journal of Chromatography B*. 2012. Vol. 902. P. 122– 131.
 100. X. Delavenne, J. Moracchini, S. Laporte et al. UPLC MS/MS assay for routine quantification of dabigatran – A direct thrombin inhibitor – In human plasma // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. Vol. 58. P. 152–156.

101. X. Delavenne, L. Juthier, B. Pons et al. UPLC MS/MS method for quantification of mycophenolic acid and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic study // *Clinica Chimica Acta*. 2011. Vol. 412. P. 59–65.
102. P. B. Phapale, H. W. Lee, M. Lim et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantification of levosulpiride in human plasma and its application to bioequivalence study // *Journal of Chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 2280–2285.
103. C. Huang, J. Gao, L. Miao. Simultaneous determination of flucloxacillin and ampicillin in human plasma by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and subsequent application to a clinical study in healthy Chinese volunteers // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. Vol. 59. P. 157–161.
104. Polson C, Sarkar P, Incledon B et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2003. Vol. 785. P. 263-275.
105. Huck C.W., Bonn G.K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 885. P. 51–72.
106. Mutlib A.E., Strupczewski J.T. Picogram determination of iloperidone in human plasma by solid-phase extraction and by high-performance liquid chromatography-selected-ion monitoring electrospray mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B*. 1995. V. 669. P. 237–246.
107. Stanley S.M.R., Owens N.A., Rodgers J.P. Detection of flunixin in equine urine using high-performance liquid chromatography with particle beam and atmospheric pressure ionization mass spectrometry after solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. B*. 1995. V. 667. P. 95–103.
108. Teitz D.S., Khan S., Powell M. L., Jemal M. An automated method of sample preparation of biofluids using pierceable caps to eliminate the

uncapping of the sample tubes during sample transfer. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2000. V.45. P. 193–204.

109. Olesen O.V., Plougmann P., Linnet K. Determination of nortriptyline in human serum by fully automated solid-phase extraction and on-line high-performance liquid chromatography in the presence of antipsychotic drugs // J. Chromatogr. B. 2000. V. 746. P. 233–239.