

Научная статья

УДК 615.07:535.243

<http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-6-50-58>

Разработка методики количественного определения ритонавира и лопинавира в плазме крови

Павел Михайлович Манаков¹, Олег Петрович Колесов², Ирина Леонидовна Тихонова³✉,
Михаил Валерьевич Питерский⁴

^{1,2} Бюро судебно-медицинской экспертизы, Екатеринбург, Россия

³ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

⁴ Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия

✉ koritca14@gmail.com

Аннотация

Введение. Терапевтический мониторинг антиретровирусных препаратов (АРВП) необходим в рутинной практике, как для объективного контроля приверженности, так и для обеспечения персонализированного подхода к лечению пациентов. Большинство методик количественного определения АРВП, в частности, Ритонавира и Лопинавира, проводятся с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектором (ВЭЖХ-МС/МС) или моноквадрольным детектором (ВЭЖХ-МС). Однако перечисленные методики предусматривали использование большого спектра дорогостоящих растворителей высокой чистоты и очень чувствительны к буферам, что ограничивает их применение. **Цель работы** – разработать методику количественного определения концентрации Ритонавира и Лопинавира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ, оптимальной для рутинной практики, а также установить линейные диапазоны определяемых концентраций. **Материалы и методы.** В исследовании были использованы лекарственные средства: Ритонавир и Лопинавир. Для внутреннего стандарта использовалось лекарственное средство Эфавиренз. В качестве тестовых образцов использовали случайно отобранные пробы крови с антикоагулянтом от пациентов, не принимавших антиретровирусные препараты. Анализ проводили методом ВЭЖХ-УФ на приборе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором, используя программное обеспечение OpenLab CDS. Расчёт калибровочных кривых производился с помощью математической модели линейной регрессии, построенной на основе метода наименьших квадратов. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного продукта «Statistica v.12» (StatSoft Russia). **Результаты.** Линейный диапазон определения концентрации в плазме крови составил для Ритонавира 1-50 мкг/мл, для Лопинавира 2-100 мкг/мл ($R^2 > 0,999$). За счёт короткого времени удержания – менее 7 минут, методика позволяет исследовать до 7,5 образцов в час на одном приборе. **Обсуждение.** Большинство методик количественного определения Ритонавира и Лопинавира для терапевтического мониторинга АРТ проводятся с использованием ВЭЖХ-МС/МС или ВЭЖХ-УФ, однако все они предусматривали использование большого спектра дорогостоящих растворителей высокой степени очистки, длительное время анализа и пробоподготовки, что препятствовало внедрению этих методов в рутинную практику. **Заключение.** Разработанная методика количественного определения концентрации Ритонавира и Лопинавира в плазме крови с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) обладает достаточно широким линейным диапазоном определения концентраций с линейной аппроксимацией измерений, точно характеризующей концентрацию препаратов, и высокой производительностью для дальнейшей валидации и внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: Лопинавир, Ритонавир, ВЭЖХ-УФ, количественное определение, терапевтический мониторинг, антиретровирусная терапия

Для цитирования: Манаков П.М., Колесов О.П., Тихонова И.Л., Питерский М.В. Разработка методики количественного определения ритонавира и лопинавира в плазме крови. *Уральский медицинский журнал*. 2023;22(6):50–58. <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-6-50-58>

© Манаков П.М., Колесов О.П., Тихонова И.Л., Питерский М.В., 2023

© Manakov P.M., Kolesov O.P., Tikhonova I.L., Piteriskiy M.V., 2023

Development of a method for the quantitative determination of ritonavir and lopinavir in blood plasma

Pavel M. Manakov¹, Oleg P. Kolesov², Irina L. Tikhonova³✉, Mikhail V. Piterskiy⁴

^{1,2} Bureau of Forensic Medical Examination, Ekaterinburg, Russia

³ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

⁴ Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russia

✉ koritca14@gmail.com

Abstract

Introduction Therapeutic monitoring of antiretroviral drugs (ARVs) is necessary in routine practice, both to objectively monitor adherence and to ensure a personalized approach to patient treatment. Most methods of quantitative determination of ARVP, in particular, ritonavir and lopinavir, are carried out using high-performance liquid chromatography with a tandem mass-selective detector (HPLC-MS/MS) or in combination with UV detection (HPLC-UV), with a single quadrupole detector (HPLC-MS). However, these methods provided for the use of a large range of expensive solvents of a high degree of purification, a long time of analysis and sample preparation, which prevented the introduction of these methods into routine practice. The aim of the study to evaluate the effectiveness of the developed technique for quantifying the concentration of Ritonavir and Lopinavir in blood plasma by HPLC-UV. **Materials and methods.** The following drugs were used in the study: Ritonavir and Lopinavir. Efavirenz was used for the internal standard. Randomly selected blood samples with anticoagulant from patients who did not take antiretroviral drugs were used as test samples. Chromatographic separation and detection were performed by HPLC-UV. The chromatographic separation process was controlled and the chromatographic analysis results were processed using the OpenLab CDS Chromatographic Data System software. The calibration curves were calculated using a linear regression mathematical model based on the least square's method. Statistical data processing was carried out using the software product "Statistica v.12" (StatSoft Russia). **Results** The linear range of plasma concentration determination was 1-50 µg/ml for Ritonavir and 2-100 µg/ml for Lopinavir. Due to the short retention time – less than 7 minutes, the technique allows you to examine up to 7.5 samples per hour on one device. **Discussion** Most of the methods of quantitative determination of Ritonavir and Lopinavir for therapeutic monitoring of ART are carried out using HPLC-MS/MS or HPLC-UV, however, all of them provided for the use of a large range of expensive solvents of a high degree of purification, a long time of analysis and sample preparation, which prevented the introduction of these methods into routine practice. **Conclusion** The developed technique for quantifying the concentration of Ritonavir and Lopinavir in blood plasma using high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector (HPLC-UV) has a sufficiently wide linear range of concentration determination and high performance for further validation and implementation into clinical practice.

Keywords: lopinavir, ritonavir, HPLC-UV, quantification, therapeutic monitoring, antiretroviral therapy

For citation: Manakov PM, Kolesov OP, Tikhonova IL, Piterskiy MV. Development of a method for the quantitative determination of ritonavir and lopinavir in blood plasma. *Ural Medical Journal*. 2023;22(6):50–58. (In Russ.). <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-6-50-58>

ВВЕДЕНИЕ

Согласно основным статистическим данным федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации за период с 2006 по 2021 год поражённость ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации выросла в 3,2 раза (с 238,0 в 2006 г. до 754,8 на 100 тыс. человек) [1,2]. Рост поражённости происходил на фоне увеличивающегося охвата антиретровирусной терапией (АРТ) лиц, живущих с ВИЧ/СПИД (ЛЖВС). Своевременно и правильно назначенная АРТ значительно улучшает выживаемость и качество жизни пациентов, только в случае если пациент строго соблюдает все предписания и гра-

фик приема антиретровирусных препаратов (АРВП) [3]. Периодическое снижение концентрации АРВП в плазме крови приводит не только к росту вирусной нагрузки ВИЧ, но и к повышению вероятности возникновения мутаций лекарственной устойчивости [4]. В результате применяемая схема АРТ оказывается неэффективной, вирусная нагрузка продолжает нарастать за счёт резистентного штамма ВИЧ, болезнь прогрессирует [5], кроме того в популяции начинают циркулировать резистентные штаммы ВИЧ. Так в Российской Федерации распространённость первичной лекарственной устойчивости за период 2006-2022 года составляла 5,4%, а в 2022 году достигла 10% [6].

Мониторинг концентрации АРВП в плазме крови в основном используют для отдельных научных исследований, таких как постмаркетинговые клинические исследования фармакокинетики АРВП для корректировки доз и режима приёма отдельным категориям пациентов [7–10].

Между тем, мониторинг концентрации АРВП в плазме крови необходим и в рутинной практике, как для объективного контроля приверженности, так и для обеспечения персонализированного подхода к лечению пациентов с почечной и (или) печеночной недостаточностью. Традиционные методы контроля приёма антиретровирусных препаратов, такие как измерение вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови, анализ своевременности диспансерного наблюдения, измерение остатка лекарств не позволяют точно оценить приверженность пациента к лечению [11]. Наиболее объективным методом подтверждения соблюдения режима является определение фактического присутствия лекарственного средства в биологических жидкостях [12].

Исследование, проведённое в 2019–2022 году в г. Иркутске, продемонстрировало высокую частоту выявления пациентов с концентрациями антиретровирусных препаратов ниже терапевтического диапазона. В группе пациентов с вирусной нагрузкой ВИЧ более 1000 копий/мл, доля пациентов с

концентрацией Ритонавира ниже терапевтической составила 64,7% [13].

Нами были выбраны два наиболее часто применяемых АРВП: Лопинавир и Ритонавир. В 2019–2020 году бустированный (за счёт Ритонавира 50 мг) ингибитор протеазы Лопинавир 200 мг, реализуемый в России преимущественно под двумя торговыми наименованиями Калетра (производитель AbbVie, США) и Калидавир (производитель ООО «Фармсинтез», Россия) занимал лидирующие позиции в структуре закупаемых и назначаемых антиретровирусных препаратов [14].

Лопинавир является пептидомиметическим ингибитором протеазы ВИЧ. Это органическое соединение, содержащее 3 бензольных кольца, 4 атома азота и 5 атомов кислорода. (рис. 1). Лопинавир практически нерастворим в воде, свободно растворим в метаноле, этаноле и изопропанол (Lopinavir. PubChem Compound Summary for CID 92727).

Ритонавир является производным L-валинамида (рис.1). Он ингибирует цитохром человеческой печени CYP3A, входящий в состав монооксидазы [15], а также обладает ингибирующей активностью в отношении протеазы ВИЧ. Ритонавир практически нерастворим в воде, свободно растворим в метаноле, этаноле и изопропанол (Ritonavir. PubChem Compound Summary for CID 392622).

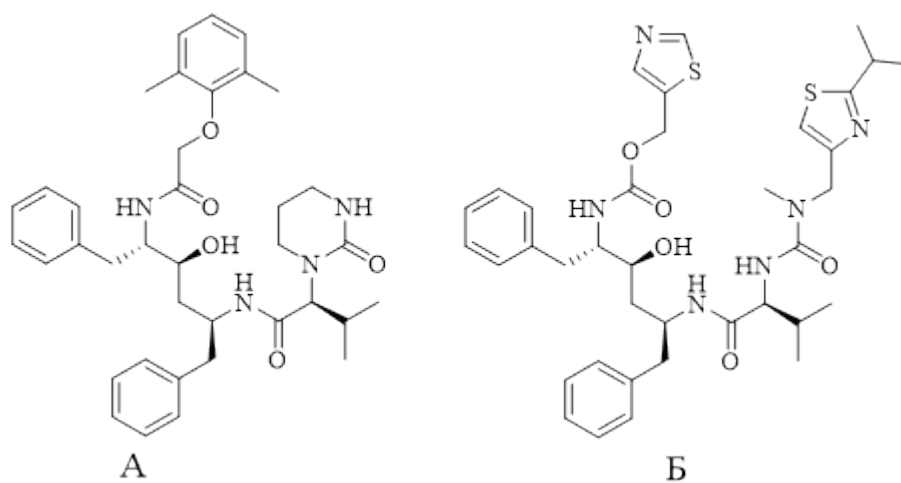


Рис. 1. Химическая структура Лопинавира (А) и Ритонавира (Б)

В настоящее время Ритонавир используется в низких дозах как средство фармакокинетического усиления других ингибиторов протеазы ВИЧ. Эффект усиления их действия достигается за счёт ингибирования монооксидазы, участвующей в метаболизме лекарств.

Принимая во внимание, что бустированные ингибиторы протеазы и/или Ламивудин (ЗТС) входят в состав большинства как приоритетных, так и альтернативных схем антиретровирусной терапии [16], определение их концентраций в плазме крови является важным диагностическим аспектом, необходимым для большинства пациентов с вирусологической неэффективностью лечения.

Цель работы – разработать методику количественного определения концентрации Ритонавира и Лопинавира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ, оптимальной для рутинной практики, а также установить линейные диапазоны определяемых концентраций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы ацетонитрил для хроматографии (сорт по ТУ 2634-002-54260861-2013), муравьиная кислота чистая для анализа 99,7 % (по ГОСТ 5848-73), спирт изопропиловый химически чистый (по ТУ 2632-181-44493179-2014). Анализируемые лекарственные средства: Ритонавир в виде чистого сухого веще-

ства (содержание 99,9 %), Лопинавир в виде чистого сухого вещества (содержание 99,9 %). Для внутреннего стандарта использовалось лекарственное средство Эфавиренз в виде чистого сухого вещества (содержание 99,9 %).

В качестве тестовых образцов использовали случайно отобранные пробы крови с антикоагулянтом от пациентов, не принимавших антиретровирусные препараты. Образцы биологических материалов хранили при температуре -25°C. Образцы крови после размораживания центрифугировали при 3000 об/мин (1800×g) в течение 10 мин при +4° С. Из центрифугированных образцов отобрали 8 аликвот плазмы крови и поместили в пенициллиновые флаконы вместимостью 10 мл. Приготовлены стандартные растворы Лопинавира и Ритонавира путем растворения навесок Ритона-

вира (содержание 99,9 %) и Лопинавира (содержание 99,9 %) в изопропиловом спирте (ХЧ 99,98 % по паспорту). Для приготовления калибровочных образцов в 0,899 мл аликвоты плазмы добавили стандартные растворы, обеспечив 7 уровней концентрации определяемых веществ: для Ритонавира от 1 до 50 мкг/мл, для Лопинавира от 2 до 100 мкг/мл. Эфавиренз использовался в качестве внутреннего стандарта и был добавлен в равных концентрациях во все аликвоты. В аликвоту «интактная плазма» антиретровирусные препараты не добавляли. В аликвоты стандартных образцов №№ 1, 2, 3 добавили растворы аналитов и стандарта до обеспечения максимальных исследуемых концентраций: Эфавиренз до 25 мкг/мл, Ритонавир до 50 мкг/мл и Лопинавира до 100 мкг/мл соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Концентрации анализируемых веществ в исследуемых образцах

№ образца	Тип образца	Концентрация используемого аналита, мкг/мл		Концентрация внутреннего стандарта (Эфавиренз), мкг/мл
		Ритонавир	Лопинавир	
1	Калибровочный образец № 1	1	2	25
2	Калибровочный образец № 2	10	40	25
3	Калибровочный образец № 3	25	50	25
4	Калибровочный образец № 4	50	100	25
5	Интактная плазма	0	0	0
6	Стандартный образец №1 (Эфавиренз)	0	0	25
7	Стандартный образец №2 (Ритонавир)	50	0	0
8	Стандартный образец №3 (Лопинавир)	0	100	0

В образец «интактная плазма» также был добавлен 101 мкл изопропилового спирта, в остальные пробы изопропиловый спирт добавляли для доведения объема пробы до 1000 мкл.

После добавления в аликвоты растворов АРВП и изопропилового спирта, образцы перемешивали на вортексе в течение 10 секунд.

Хроматографическая пробоподготовка заключалась в добавлении в каждый образец 1 мл ацетонитрила, перемешивании на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 сек, затем центрифугировании в течение 15 мин со скоростью 13 000 об/мин. Из полученного супернатанта отбирали по 1 мл и переносили в хроматографические виалы, которые помещали в автосамплер хроматографа.

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с УФ детекцией (ВЭЖХ-УФ). Управление процессом хроматографического разделения и обработку результатов хроматографического анализа проводили с помощью программного обеспечения «Система хроматографических данных OpenLab CDS».

Разделение проводили при 30°C на колонке C18 (Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical 100

мм × 4,6 мм, 5 мкм) с использованием предколонки Agilent Zorbax Original ODS (C18) Guard Cartridge 12,5 мм × 4,6 мм, 5 мкм.

Детектирование спектров проводили в диапазоне длин волн от 210 до 400 нм. В качестве подвижной фазы использовали элюент А – ацетонитрил; элюент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (по объёму). Градиент по составу подвижной фазы не использовали. Подвижная фаза вводилась со скоростью потока 0,9 мл/мин, элюэнты А и В смешивались в долях 60 % и 40 % соответственно. Объем вводимой пробы составлял 30 мкл. Время инъекции составляло 12 мин.

Калибровочные кривые были построены на основе невзвешенной линейной регрессии, рассчитанной по методу наименьших квадратов. Полученную математическую модель, описывающую зависимость площади пика от концентрации аналита, оценивали с помощью коэффициента детерминации (R²).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного продукта «Statistica v.12» (StatSoft Russia).

РЕЗУЛЬТАТЫ

УФ-спектры молекул Ритонавира, Лопинавира и Эфавиренза отличались друг от друга (рис. 2).

Максимальное поглощение для исследуемых АРВП находилось в диапазоне от 238 до 260 нм. По результатам исследования калибровочных образцов аналитически значимая длина волны для Ритона-

вира составила 239 нм, для Лопинавира – 260 нм, для Эфавиренза – 247 нм. Таким образом, одновременное выявление указанных АРВП не создавало эффекта интерференции.

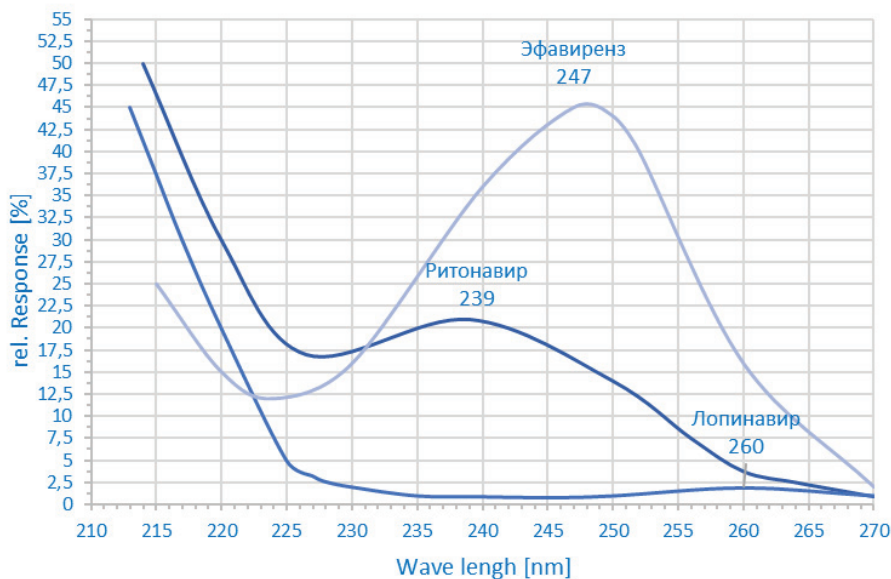


Рис. 2. Ультрафиолетовые спектры поглощения Ритонавира, Эфавиренза и Лопинавира

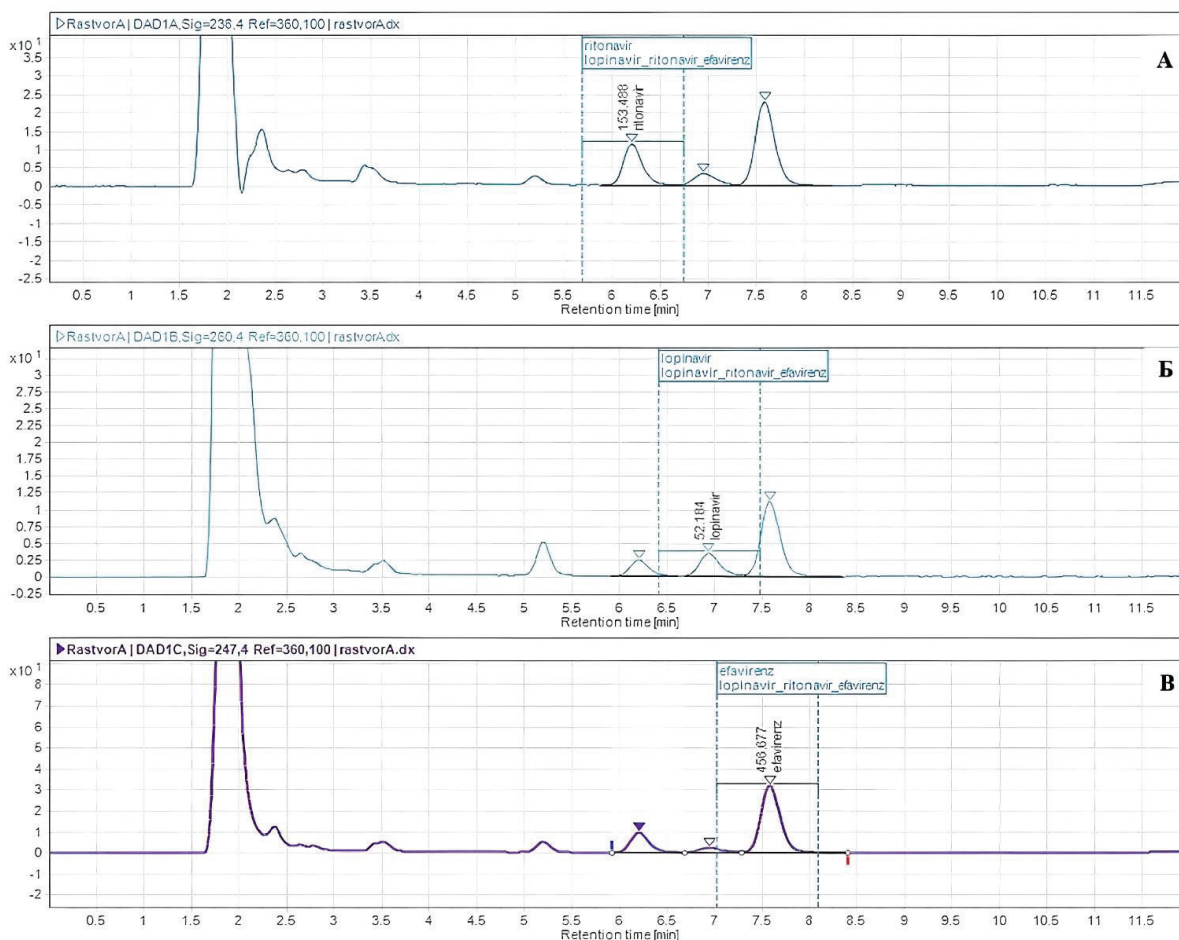


Рис. 3. Хроматограммы, полученные для калибровочного образца № 2, с тремя длинами волн УФ-детектора 238, 260, 247 нм (хроматограммы А, Б и В соответственно). Концентрации веществ в плазме: 10, 40, 25 мкг/мл для Ритонавира, Лопинавира и Эфавиренза соответственно

Время удерживания было определено при хроматографическом разделении веществ в пробах, содержащих стандартные образцы. Время удерживания у Ритонавира составило 6,25 мин, у Лопинавира – 6,97 мин, у Эфавиренза – 7,58 мин. Таким образом, достаточным временем для хроматографического разделения является 8 мин, что характеризует методику как значительно более быструю, чем аналогичные.

Графическое отображение пиков продемонстрировало чёткое разделение определяемых ве-

ществ. Максимальная площадь пика для каждого вещества определялась при сканировании на длине волны, установленной при изучении ультрафиолетовых спектров поглощения (рис. 3).

Фактор асимметрии для пиков АРВП варьировал от 1,17 до 1,28, что характеризует пики как достаточно симметричные с незначительным растяжением заднего фронта пика. Разрешение для хроматографических пиков Ритонавира и Лопинавира были выше 1,5 – минимального разрешения для полного разделения (табл. 2).

Таблица 2

Хроматографические параметры методики выявления Ритонавира и Лопинавира с использованием в качестве внутреннего контроля Эфавиренза

АРВП	Аналитическая длина волны, нм	Время удерживания, мин	Фактор асимметрии	Разрешение
Ритонавир	238	6,25	1,28	1,694
Лопинавир	260	6,97	1,22	1,877
Эфавиренз	247	7,58	1,17	

Исследование пробы, содержащей «интактную» плазму, не выявило значимых пиков детектируемых длин волн ультрафиолетового спектра в пределах от 210 до 400 нм.

Селективность методики была подтверждена отсутствием мешающих пиков от эндогенных соединений в пробе, содержащей «интактную» плазму.

Извлечение лекарственных веществ из биологического материала превышало 85%. Минимальные пределы обнаружения составили 0,5 нг/мл для Ритонавира и 1 нг/мл для Лопинавира.

Для построения градуировочных кривых (рис. 4) использовали рабочие растворы на трёх уровнях концентраций в трех повторностях, бланк (чистая матрица) и бланк с внутренним стандартом (матрица без введения аналита, но с добавлением внутреннего

стандарта). Диапазон протестированных концентраций составлял от 1 до 100 мкг/мл для Ритонавира и от 2 мкг/мл до 200 мкг/мл для Лопинавира.

Разработанная методика имела линейный диапазон количественного определения в четырёх из пяти протестированных концентрациях: для Ритонавира от 1 до 50 мкг/мл и для Лопинавира от 2 до 100 мкг/мл. Калибровочные кривые всех анализируемых веществ во всех матрицах были линейными в данном диапазоне с коэффициентами детерминации >0,9996 (рис. 4).

Все антиретровирусные препараты (в том числе внутренний стандарт) были стабильны в течение, по крайней мере, 2 месяцев при температуре -20°C и в течение 12 часов на лабораторном столе при комнатной температуре.

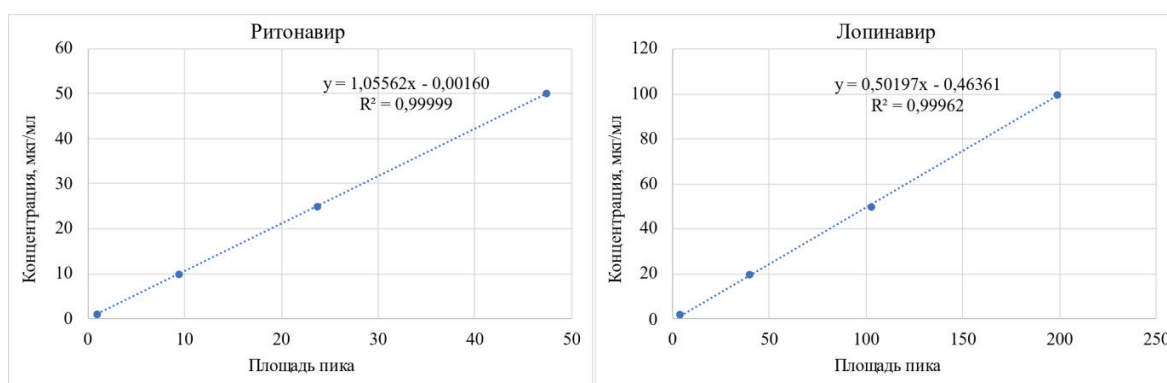


Рис. 4. Калибровочные графики для Ритонавира и Лопинавира

Стоимость реагентов (без учёта стоимости колонок) для проведения одного анализа не превышала 200 рублей (по ценам 2023 года), при этом производительность метода позволяла исследовать до 5 образцов в час. Учитывая максимальное время удержания в 7,58 минут, приборное время можно сократить, обеспечив производительность

до 7,5 образцов в час на одном анализаторе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство методик количественного определения Ритонавира и Лопинавира проводятся с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектором (ВЭЖХ-МС/МС) или моноквадроль-

ным детектором (ВЭЖХ-МС) [17–21].

Количественное определение Ритонавира с помощью ВЭЖХ-МС/МС позволяет выявлять более низкие концентрации Ритонавира, чем в разработанном нами методе: от 0,28 нг/мл с линейным диапазоном 0,3–20 нг/мл, при этом время удержания Ритонавира составляло 14,47 минут [22], однако стоимость, трудоёмкость, низкая производительность исследования и дороговизна приборной базы пока не позволяют распространить данную методику в качестве клинической диагностики.

В период с 2002 по 2007 гг. был опубликован ряд статей, описывающих методики определения Лопинавира и Ритонавира методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с УФ-детекцией (ВЭЖХ-УФ).

Линейные диапазоны определения Ритонавира и Лопинавира при реализации методики, разработанной в г. Бордо (Франция) в 2001 году, составляли от 0,1 до 10 мкг/мл [23], в соответствии с методикой 2002 года, валидированной в г. Неймеген (Нидерланды) – от 50 до 30000 нг/мл [24], по методике 2004 года (г. Нант, Франция) от 0,15 нг/мл до 7,5 мкг/мл [25], по методике разработанной в 2005 году в г. Рим (Италия) – от 0,5 до 5 мкг/мл [26], по методике 2007 года, разработанной в г. Левен (Бельгия) – от 0,025 до 10 мкг/мл [27]. Минимально возможное время удержания для определения концентрации Ритонавира и Лопинавира в соответствии с указанными методиками составляло: 20, 17, 27, 25, 17 минут соответственно.

Нижняя граница линейного диапазона определения концентраций определяет эффективность детектирования и считается важной аналитической величиной, так как верхняя граница диапазона – величина тривиальная (может быть увеличена разбавлением пробы) [28]. Однако терапевтические концентрации Лопинавира должны составлять не менее

4 мкг/мл [29], а Ритонавира не менее 2,1 мкг/мл [30]. Нижняя граница линейного диапазона концентраций в 1 мкг/мл для Ритонавира и 2 мкг/мл для Лопинавира, установленная в нашей методике, превзошла данный показатель. Более высокая эффективность детектирования, рассчитанная для указанных выше методик ВЭЖХ-УФ, требовала использование широкого спектра дорогостоящих растворителей высокой степени очистки, длительное время анализа и пробоподготовки, что препятствовало их внедрению в рутинную практику. Между тем для терапевтического мониторинга не требуется определения столь низких концентраций, напротив, востребована максимальная экономическая эффективность и производительность. Производительность разработанной методики оказалась как минимум в 2 раза выше методики ВЭЖХ-УФ, описанных ранее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения Лопинавира и Ритонавира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ благодаря прямому количественному определению концентраций АРВП в плазме крови позволяет объективно определять приверженность к лечению и является элементом персонализированной медицины.

Минимальные пределы обнаружения составили 0,1 мкг/мл для Ритонавира и 0,002 мкг/мл для Лопинавира.

Диапазоны определяемых концентраций от 1 до 50 мкг/мл для Ритонавира и от 2 до 100 мкг/мл для Лопинавира имели линейную зависимость концентрации от площади пика при $R^2 > 0,9996$.

При стоимости исследования, не превышавшей 200 рублей за пробу, максимально возможная производительность составляла 7,5 проб/час, что позволяет использовать разработанную методику для масштабного мониторинга концентрации основных АРВП у ЛЖВС, получающих АРТ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Финансирование исследования осуществлялось за счёт субсидии на выполнение НИР (рег. номер в ЕГИСУ НИОКТР 121041500042-8) п.1.2.1 отраслевой программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

Этическая экспертиза не требуется.

Conflicts of interests

The authors declare no conflicts of interests.

Funding source

The research was financed by a subsidy for the implementation of research (registration number in the EGISU NIOKTR 121041500042-8) clause 1.2.1 of the sectoral program of Rospotrebnadzor for 2021–2025. “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases”.

Ethics approval is not required.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Покровский В. В., Ладная Н. Н., Соколова Е. В. с соавт. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень №33. Москва: Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 24 с. Доступно по: <http://www.hivrussia.info/elektronnye-versii->

informatsionnyh-byulletenij/ [доступ 30 ноября 2023].

Pokrovskii VV, Ladnaia NN, Sokolova EV et al. HIV infection. Informatcionnyi biulleten №33. Moscow: HIV Monitoring Reference Center FBIS Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2009. 24 p. (In Russ.). Available at: <http://www.hivrussia.info/elektronnye-versii-informatsionnyh-byulletenij/> [Accessed 30th November 2023].

2. Покровский В. В., Ладная Н. Н., Соколова Е. В. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень №46. Москва: Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; 2021. 83 с. Доступно по: <http://www.hivrussia.info/elektronnye-versii-informatsionnyh-byulletenij/> [доступ 30 ноября 2023].

Pokrovskii VV, Ladnaia NN, Sokolova EV. HIV infection. Informatcionnyi biulleten №46. Moscow: HIV Monitoring Reference Center FBIS Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2021. 83 p. (In Russ.). Available at: <http://www.hivrussia.info/elektronnye-versii-informatsionnyh-byulletenij/> [Accessed 30th November 2023].

3. Asgedom SW, Maru M, Berihun B et al. Immunologic and Clinical Failure of Antiretroviral Therapy in People Living with Human Immunodeficiency Virus within Two Years of Treatment. *BioMed Research International*. 2020;2020:1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/5474103>.

4. Kausar S, Said KF, Ishaq Mujeeb Ur Rehman M et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2021;35:205873842110026. <https://doi.org/10.1177/20587384211002621>.

5. Liu P, You Y, Liao L et al. Impact of low-level viremia with drug resistance on CD4 cell counts among people living with HIV on antiretroviral treatment in China. *BMC Infectious Diseases*. 2022;22(1):426. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07417-z>.

6. Kirichenko A, Kireev D, Lapovok I et al. HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia: Analysis of the National Database, 2006–2022. *Viruses*. 2023;15(4):1-16. <https://doi.org/10.3390/v15040991>.

7. Crommentuyn KML, Kappelhoff BS, Mulder JW et al. Population pharmacokinetics of lopinavir in combination with ritonavir in HIV-1-infected patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2005;60(4):378–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02455.x>

8. Schoergenhofer C, Jilma B, Stimpfl T et al. Pharmacokinetics of Lopinavir and Ritonavir in Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Annals of Internal Medicine*. 2020;173(8):670–672. <https://doi.org/10.7326/M20-1550>.

9. Best BM, Capparelli EV, Diep H et al. Pharmacokinetics of Lopinavir/Ritonavir Crushed versus Whole Tablets in Children. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2011;58(4):385–391. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e318232b057>.

10. Lamorde M, Wang X, Neary M et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics of Efavirenz 400 mg Once Daily During Pregnancy and Post-Partum. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2018;67(5):785–790. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy161>.

11. Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции. *Вопросы вирусологии*. 2022;67(3):193–205.

Ozhmegova EN, Bobkova MR. HIV drug resistance: past and current trends. *Problems of Virology*. 2022;67(3):193–205. (In Russ.) <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113>.

12. Zijp TR, Izzah Z, Åberg C et al. Clinical Value of Emerging Bioanalytical Methods for Drug Measurements: A Scoping Review of Their Applicability for Medication Adherence and Therapeutic Drug Monitoring. *Drugs*. 2021;81(17):1983–2002. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01618-7>.

13. Самбялова А.Ю., Байрова Т.А., Манаenkova Т.Л. с соавт. Вирусологическая неэффективность антиретровирусной терапии и связанные с ней социальные и клинические факторы у детей и подростков, живущих с ВИЧ-инфекцией. *Журнал инфектологии*. 2022;14(5):51–59.

Sambyalova AY, Bairova TA, Manaenkova TL et al. Virological failure of antiretroviral therapy and associated social and clinical factors in children and adolescents living with HIV. *Journal Infectology*. 2022;14(5):51–59. (In Russ.) <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-5-51-59>.

14. Иванова В.А. Анализ рынка антиретровирусных препаратов. *Иновации. Наука. Образование*. 2020;(14):108–113.

Ivanova VA. Market analysis of antiretroviral drugs. *Innovatsii. Nauka. Obrazovaniye*. 2020;(14):108–113. (In Russ.).

15. Loos NHC, Beijnen JH, Schinkel AH. The inhibitory and inducing effects of ritonavir on hepatic and intestinal CYP3A and other drug-handling proteins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;162:114636. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114636>

16. Качанов Д.А., Атангулов Г.И., Хамаде Х. с соавт. Особенности назначения антиретровирусных препаратов при лечении ВИЧ-инфицированных пациентов. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2021;104(2):25–30. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.103.2.066>.

Kachanov DA, Atangulov GI, Hamade Kh. et al. Aspects of the prescribing antiretroviral drugs in the treatment of HIV-infected patients. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal*. 2021;104(2):25–30. (In Russ.). <https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.103.2.066>.

17. Ramírez-Ramírez A, Sánchez-Serrano E, Loaiza-Flores G et al. Simultaneous quantification of four antiretroviral drugs in breast milk samples from HIV-positive women by an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method. *PLoS ONE*. 2018;13(1):e0191236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191236>.

18. Li L, Yu X, Xie D et al. Influence of traditional Chinese medicines on the in vivo metabolism of lopinavir/ritonavir based on UHPLC-MS/MS analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022;12(2):270–277. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.06.006>.

19. Chu L, Wu Y, Duan C et al. Simultaneous quantitation of zidovudine, efavirenz, lopinavir and ritonavir in human hair by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2018;1097–1098:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.08.031>

20. Dickinson L, Robinson L, Tjia J et al. Simultaneous determination of HIV protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005;829(1):82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.032>
21. Комаров Т.Н., Шохин И.Е., Мискив О.А. с соавт. Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(1):99–108.
- Komarov TN, Shohin IE, Miskiv OA et al. Development and Validation of Atazanavir and Ritonavir Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*. 2020;9(1):99–108. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108>
22. Notari S, Sergi M, Montesano C et al. Simultaneous determination of lamivudine, lopinavir, ritonavir, and zidovudine concentration in plasma of HIV-infected patients by HPLC-MS/MS. *IUBMB Life*. 2012;64(5):443–449. <https://doi.org/10.1002/iub.1025>
23. Titier K, Lagrange F, Péhourcq F et al. High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of the Six HIV-Protease Inhibitors and Two Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in Human Plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2002;24(3):417. <https://doi.org/10.1097/00007691-200206000-00015>.
24. Droste JAH, Verweij-van Wissen CPWGM, Burger DM. Simultaneous Determination of the HIV Drugs Indinavir, Amprenavir, Saquinavir, Ritonavir, Lopinavir, Nelfinavir, the Nelfinavir Hydroxymetabolite M8, and Nevirapine in Human Plasma by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2003;25(3):393. <https://doi.org/10.1097/00007691-200306000-00023>.
25. Dailly E, Raffi F, Jolliet P. Determination of atazanavir and other antiretroviral drugs (indinavir, amprenavir, nelfinavir and its active metabolite M8, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nevirapine and efavirenz) plasma levels by high performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2004;813(1):353–358. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.10.005>
26. Notari S, Bocedi A, Ippolito G et al. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2006;831(1):258–266. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.12.016>
27. Verbesselt R, Van Wijngaerden E, de Hoon J. Simultaneous determination of 8 HIV protease inhibitors in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography with combined use of UV and fluorescence detection: Amprenavir, indinavir, atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and M8-nelfinavir metabolite. *Journal of Chromatography B*. 2007;845(1):51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.068>
28. Сычев К.С., Окунская К.А. Проблематика корректной проверки пригодности и оценки экономической эффективности ВЭЖХ методик. *Аналитика*. 2021;(4): 294–298.
- Sy'chev KS, Okunskaja KA. The problems of correct verification of the suitability and evaluation of the economic efficiency of HPLC techniques. *Analitika*. 2021;(4): 294–298. (In Russ.) <https://doi.org/10.22184/2227-572X.2021.11.4.294.298>
29. Breilh D, Pellegrin I, Rouzès A et al. Virological, intracellular and plasma pharmacological parameters predicting response to lopinavir/ritonavir (KALEPHAR Study). *AIDS*. 2004;18(9):1305–1310. <https://doi.org/10.1097/00002030-200406180-00009>
30. Danner SA, Carr A, Leonard JM et al. A Short-Term Study of the Safety, Pharmacokinetics, and Efficacy of Ritonavir, an Inhibitor of HIV-1 Protease. *N Engl J Med*. 1995;333(23):1528–1534. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512073332303>

Сведения об авторах

П. М. Манаков

химик-эксперт медицинской организации,
pavel.manakov@gmail.com

О. П. Колесов

судебно-медицинский эксперт, танатолог,
заместитель начальника Бюро судебно-
медицинской экспертизы,
kop@uralsudmed.ru

И. Л. Тихонова

кандидат химических наук, доцент кафедры
общей химии, koritca14@gmail.com,
<https://orcid.org/0009-0004-9287-2451>

М. В. Питерский

научный сотрудник Уральского окружного центра
по профилактике и борьбе со СПИД,
piterskiy_mv@niivirom.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-5506-2389>

Information on the authors

P. M. Manakov

chemist-expert of a medical organization,
pavel.manakov@gmail.com

O. P. Kolesov

deputy head of the Sverdlovsk regional bureau of
forensic medical examination, forensic medical
expert of the highest category, thanatologist,
kop@uralsudmed.ru

I. L. Tikhonova

Candidate of Chemical Sciences, Associate
Professor of the Department of General Chemistry,
koritca14@gmail.com,
<https://orcid.org/0009-0004-9287-2451>

M. V. Piterskiy

researcher of the Ural Federal District AIDS Centre,
piterskiy_mv@niivirom.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-5506-2389>

Статья поступила в редакцию 20.09.2023; одобрена
после рецензирования 29.11.2023; принята к
публикации 12.12.2023.

The article was submitted 20.09.2023; approved
after reviewing 29.11.2023; accepted for
publication 12.12.2023.