

Development of HPLC-methodology of determination of amiodarone and desethylamiodarone in human blood plasma

Sitkova E.S.¹, Batalov R.E.¹, Kurgachev D.A.², Gorn E.A.², Kazantceva K.I.², Dragunova M.A.¹, Krivolapov S.N.¹, Moskovskich T.V.¹, Popov S.V.¹

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC), 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

² The National Research Tomsk State University, 36, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Background. Amiodarone is widely used as an antiarrhythmic drug, but its effectiveness is not entirely predictable, and its side effects are not completely controllable. To determine the effective concentration of amiodarone in the blood, a method for quantitative analysis of the drug in the presence of a biological matrix is needed.

Objective. To develop a procedure for quantitative determination of amiodarone (AMI) and desethylamiodarone (DEA) in blood plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and Methods. The procedure was developed using an Agilent 1260 Infinity chromatograph with diode array detector (Agilent, USA) on a Tsunami C18 Pharm column (250×4.6 mm, 5 µm) with proprietary stationary phase. Agilent Zorbax SB C8 precolumn (9.4×15 mm, 7 µm) was used to protect the column from mechanical contaminants. Validation was performed according to OFS.1.1.0012.15 “Validation of Analytical Methods” for the following parameters: selectivity, matrix

effect, linearity, accuracy, precision, stability and limits of detection and quantification.

Results. The QuEChERS sample preparation was modified to achieve optimal conditions for the extraction of AMI and DEA from the biological matrix. Mobile phase A was phosphate buffer (pH 3, 7.5 mM), mobile phase B was 100% acetonitrile. The separation was performed in gradient mode. Up to 7.00 minutes – the B phase content was 55%, from 7.00 to 7.15 minutes – an increase in B phase content to 85% in order to elute the more hydrophobic components, from 7.15 to 15.00 minutes – the B phase content did not change, followed by a return to the original 50% at 15.15 min. The total analysis time was 18 minutes. Column thermostat temperature was set to 30 °C, flow rate – 1.2 mL/min; injection volume – 80 µL; selective wavelength was 241 nm. The value of retention factor for AMI was 2.25; for DEA – 1.44

Conclusion. The authors have developed and validated the new HPLC procedure for quantitative identification of AMI and DEA in human blood plasma

Keywords: high-performance liquid chromatography; amiodarone; desethylamiodarone; human plasma; development of methodology.

Funding: the study was performed with the support of the Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia.

Adherence to ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia (protocol No. 240 from 15.02.2023).

For citation: Sitkova E.S., Batalov R.E., Kurgachev D.A., Gorn E.A., Kazantceva K.I., Dragunova M.A., Krivolapov S.N., Moskovskich T.V., Popov S.V. Development of HPLC-methodology of determination of amiodarone and desethylamiodarone in human blood plasma. *Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2025-2710>

1. Introduction

Amiodarone (AMI) is a highly effective agent for the treatment and prevention of arrhythmias, classified as a class III antiarrhythmic drug. In addition to blocking potassium channels, it exerts inhibitory effects on sodium channels, slow inward calcium current, non-competitively blocks alpha and beta adrenoreceptors, inhibits multiple ion currents, and cholinergic receptors. Currently, when it comes to prescribing antiarrhythmic therapy, 24.1% of physicians in the United States, 34.5% in Europe, and 73.8% in Latin America choose AMI as their preferred option [1]. In Russia, according to the results of a survey, AMI is prescribed in 41.2% of cases as a first-line drug and in 51.9% of cases as a second-line therapy for maintaining sinus rhythm in patients with atrial fibrillation in the presence of structural myocardial disease [2, 3].

The effectiveness of AMI has been proven in the treatment of most cardiac arrhythmias, including premature beats of any origin, paroxysmal supraventricular tachycardias, paroxysmal atrial fibrillation and flutter, paroxysmal tachycardias in patients with ventricular pre-excitation syndromes, both coronary and non-coronary ventricular tachycardias, acting as both primary and secondary prevention of sudden cardiac death. Based on the results of a systematic review, the effectiveness of AMI in maintaining sinus rhythm ranges from 30% to 95.2% [4].

The pharmacokinetics of AMI are unique and complex, attributed to its high lipophilicity and nearly complete binding to plasma proteins, as well as extensive distribution in tissues (adipose tissue, liver, lungs, adrenal glands, testes, lymph nodes, skin) [5, 6]. AMI is metabolized in the liver with the involvement of cytochrome P450, forming its major metabolite, desethylamiodarone (DEA). The latter is pharmacologically active and can enhance the therapeutic effects of the initial compound [7]. According to a meta-analysis of 13 randomized controlled trials, the frequency of amiodarone's adverse effects was analyzed, including thyroid dysfunction (hypothyroidism in 6%, hyperthyroidism in 0.9%), pulmonary toxicity – 1%, hepatic toxicity – 0.6%, peripheral neuropathies – 0.3% [8], and polymorphic ventricular tachycardia not exceeding 1.5% [9, 10].

One of the significant challenges in the field of arrhythmology is that antiarrhythmic drugs have a narrow therapeutic window, which poses objective difficulties in their dosing. Even minor changes in their pharmacokinetics, resulting in concentration alterations of active substance in the blood, can lead to both reduced efficacy and increased toxicity. Considering the large number of generic drugs available in the pharmacological market, this issue is crucial. Since measuring amiodarone and its metabolites in serum is not a standard clinical practice, the effects of switching between the original and generic drug, or between different generic versions of AMI, can manifest over several weeks, which may go unnoticed in routine patient care.

Previously, various analytical methods have been used for the quantitative determination of AMI in pharmaceutical preparations, including high-performance liquid chromatography (HPLC), high-performance thin-layer chromatography (Yang and Fang, 1995), liquid chromatography (Gupta and Connelly, 1984; Geoffriau et al., 1992), infrared spectroscopy (Jensen et al., 1988), Raman spectroscopy (Orkoula et al., 2007), fluorescence spectroscopy (Mohamed et al., 1998), immunoassay, and electrochemical methods (Saita et al., 2002; Ball et al., 1996), and methods for determining AMI in biological fluids using HPLC-MS, HPLC with chemiluminescence and ultraviolet detection were developed [11, 12]¹. The HPLC method is more selective than previously described methods and has high sensitivity. That's why it was chosen for development by the authors of this article.

The substantial variability observed in the pharmacokinetics of AMI complicates its optimal dosing for individual patients. Attempts to personalize AMI therapy and correlate its concentration with the efficacy and safety of treatment have been made repeatedly. Dose-dependence has been noted not only in pharmacological cardioversion and heart rate control [13–16], but also in the development of adverse effects. Nevertheless, individual data indicate that achieving the target therapeutic concentration of AMI often does not correspond to the expected clinical effect [17].

¹ OFS.1.2.1.2.0001 Chromatography. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 15th ed.; Moscow; 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya/> (06.10.2025).

None of the methods used in the studies for determining the concentration have been incorporated into routine clinical practice, leaving all potential prospects for understanding the effects of AMI and its personalized use in patients unrealized.

Research objective is to develop a procedure for quantitative determination of AMI in blood plasma by HPLC.

2. Materials and Methods

2.1 Experiment design

In the process of the procedure developing, a number of tasks were performed. First of all, the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) sample preparation was modified to achieve optimal conditions for the extraction of AMI and DEA from the biological matrix. Further, chromatographic analysis conditions were developed to achieve the required specificity. The final step was to evaluate the suitability of the developed procedure for the quantitative determination of the drug in blood plasma according to the criteria of specificity, accuracy, linearity, precision and limits of detection and quantification.

2.2 Equipment

The procedure was developed using an Agilent 1260 Infinity chromatograph with diode array detector (Agilent, USA) on a Tsunami C₁₈ Pharm column (250×4.6 mm, 5 µm) with proprietary stationary phase. Agilent Zorbax SB C₈ precolumn (9.4×15 mm, 7 µm) was used to protect the column from mechanical contaminants. CLn-16 Centrifuge (Xiangzhi Centrifuge Instrument Co., Ltd, China), Analytical Balances GR-200 (AND, Japan), ELMi CM-50 centrifuge (ELMI, USA), Ultrasonic bath Elmasonic P (Elma Germany), 200-1000 µL and 50-200 µL mechanical pipettes (Eppendorf, US), IKA Vortex Genius 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany), 1.5 ml Eppendorf tubes (Minimed, Russia), and transparent glass vials for chromatography (Interlab, Russia) were used during the sample preparation.

2.3 Reagents

Sodium chloride (lab grade, Minimed, Russia) and acetonitrile (HPLC-grade, PanReac, Spain) were used for proteins precipitation and extraction of the analytes.

2.4. Sample preparation

2.4.1 Standard samples

Samples of the dosage form “Amiodarone, concentrate for preparation of solution for intravenous administration 50 mg/mL”, active substances of caffeine (Organica, Russia), ibuprofen (Organica, Russia), nicotine (Sigma Aldrich) and drotaverine hydrochloride (Organica, Russia); placebo (blood plasma samples from an intact patient), and primary standartized samples of AMI (Clearsynth, Mumbai, India, 50 mg) and DEA (Clearsynth, Mumbai, India, 10 mg) were used for procedure development and validation.

2.4.2 Model Sample Preparation

A mixture of acetonitrile and phosphate buffer in a 50:50 volume ratio was used as the solvent. Working solutions of AMI and DEA were prepared in advance for adding the additive to the blood samples of a healthy volunteer. 5 mg of AMI and DEA were added to a 100.0 ml volumetric flask, the solution was made up to the mark with solvent, and mixed. Sample preparation was performed according to the simplified QuEChERS method. Blood of intact patient was collected into sterile 6–9 mL tubes with EDTA buffer, followed by centrifugation for 10 min at a speed of 3000 rpm with subsequent selection of 450 μ L of blood plasma and transfer to a 1.5 ml Eppendorf tube. Then 50 μ L of amiodarone solution (concentration was equal to 0.5; 0.8; 1.25; 1.6; 2.5 μ g/L), 0.33 ± 0.04 g of NaCl and 500 μ L of acetonitrile extractant were added to the plasma sequentially followed by vortexing for 10 seconds at maximum speed, centrifugation for 5 minutes at 15,000 rpm and collection of supernatants that was placed above the layer of protein deposited at the liquid-liquid interface and followed by transfer of the contents into a vial with an insert and HPLC analysis.

2.4.3 Real Sample Preparation

Blood of the patient treated with AMI was collected into sterile 6–9 mL tubes with EDTA buffer, followed by centrifugation for 10 min at a speed of 3000 rpm with subsequent selection of 500 μ L of blood plasma and transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube. Then 0.33 ± 0.04 g of NaCl and 500 μ L of acetonitrile extractant were added to the plasma sequentially followed by vortexing for 10 seconds at maximum speed, centrifugation of for 5 minutes at 15,000 rpm and collection of supernatants. Blank samples were collected from intact patients, using the same sample preparation algorithm.

2.5 HPLC-DAD Conditions

The analysis was performed by HPLC with diode array detector. The column used for the study was Tsunami C18 Pharm, created in the Laboratory of Physicochemical Methods of Analysis of Tomsk State University. Mobile phase A was phosphate buffer (pH 3, 7.5 mM), mobile phase B was 100% acetonitrile. The separation was performed in gradient mode. Up to 7.00 minutes, the B phase content was 55%, then from 7.00 to 7.15 minutes there was an increase in B phase content to 85% in order to elute the more hydrophobic components. From 7.15 to 15.00 minutes the B phase content did not change, followed by a return to the original 50% at 15.15 min. The total analysis time was 18 minutes. Column thermostat temperature was set to 30 °C, flow rate – 1.2 mL/min; injection volume – 80 μ L; selective wavelength was 241 nm. Typical chromatogram of plasma sample is presented on Figure 1. The value of retention factor for AMI was 5.2; for DEA – 3.4

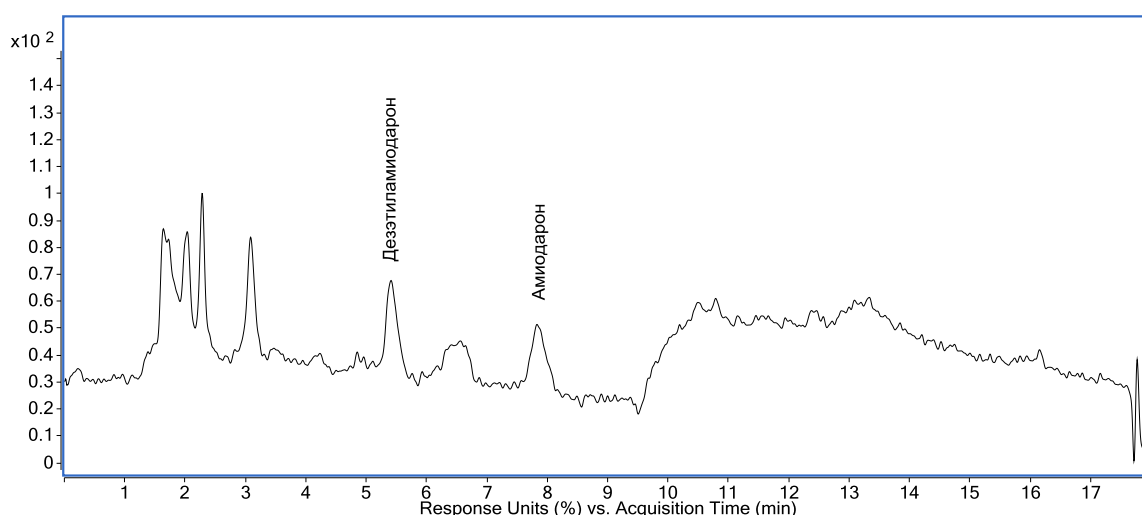


Figure 1. Typical chromatogram of a plasma sample containing amiodarone and desethylamiodarone

2.6 Method validation

Validation was performed according to OFS.1.1.0012.15 “Validation of Analytical Methods” for the following parameters: selectivity, matrix effect (by plotting a calibration curve relative to AMI content in plasma after sample preparation for different concentration levels), linearity, accuracy, precision, stability and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Table 1 contains the list of evaluation criteria that was formed according to OFS.1.1.0012.15.

Table 1. Procedure suitability criterion

Parameter	Procedure suitability criteria
Selectivity	Resolution between peaks of analytes and components of blood plasma, non-steroidal anti-inflammatory drugs, caffeine and nicotine not less than 1.5
Linearity	Correlation coefficient of linear regression in the range from 50% to 200% of average therapeutic concentration not less than 0.99
Repeatability	% RSD not more than 5%
Intermediate precision	% RSD not more than 10%
Accuracy	% recovery from 85% to 115% (from 70% to 130% for LOQ)

2.6.1 Specificity

The specificity of the procedure was evaluated in relation to the drugs most commonly used in medical practice. This group includes non-steroid anti-

inflammatory drugs (Ibuprofen), neuromimetics (Caffeine), spasmolytic drugs (Drotaverine). Specificity was also assessed in relation to the main metabolite of AMI.

2.6.2 Linearity

The linearity range of the procedure was evaluated by linear regression calibration curves for model plasma samples of amiodarone. Model samples were prepared according to the procedure, described previously, using modified QuEChERS method.

Working solutions of AMI were prepared in advance for adding the additive to the blood samples of a healthy volunteer. 5 mg of AMI was added to a 100.0 ml volumetric flask, the solution was made up to the mark with solvent, and mixed. Calibration solutions A–I were prepared from the working solution in a concentration range of 0.005–0.025 mg/ml.

Solution A. 5.0 mL of the solution was added to a 10.0 mL flask, made up to the mark with solvent, and mixed. The solution contained an amine at a concentration of 0.025 mg/mL.

Solution B. 3.2 mL of the solution was added to a 10.0 mL flask, made up to the mark with solvent, and mixed. The solution contained an amine at a concentration of 0.016 mg/mL.

Solution C. 2.5 mL of the solution was added to a 10.0 mL flask, made up to the mark with solvent, and mixed. The solution contained an amine at a concentration of 0.013 mg/mL.

Solution D. 1.6 mL of the solution was added to a 10.0 mL flask, made up to the mark with solvent, and mixed. The solution contained an amine at a concentration of 0.008 mg/mL.

Solution I. 1.0 ml of the solution was added to a 10.0 ml flask, made up to the mark with solvent, and mixed. The solution contained 0.005 mg/ml of AMI.

Sample preparation for linearity testing was performed using the QuEChERS method. Blood patient's samples was collected into sterile 6–9 mL tubes with EDTA

buffer, followed by centrifugation for 10 min at a speed of 3000 rpm with subsequent selection of 450 μL of blood plasma and transfer to a 1.5 ml Eppendorf tube. Then 50 μL of amiodarone solution (concentration was equal to 0.5; 0.8; 1.25; 1.6; 2.5 $\mu\text{g/L}$), 0.33 ± 0.04 g of NaCl and 500 μL of acetonitrile extractant were added to the plasma sequentially followed by vortexing for 10 seconds at maximum speed, centrifugation for 5 minutes at 15,000 rpm and collection of supernatants that was placed above the layer of protein deposited at the liquid-liquid interface and followed by transfer of the contents into a vial with an insert and HPLC analysis. The constructed calibration dependence is shown in Figure 5. A linear dependence was also obtained for DEA. Based on these lines, the response factor (F) for DEA relative to AMI was calculated, equal to 1.450.

2.6.3 Precision (repeatability and intermediate precision)

Repeatability was evaluated by measuring the analytical signal for three samples, three parallel measurements for each sample. The measurements were performed within a short time interval, using the same equipment and reagents, by a single analyst. Intermediate (in-laboratory) precision was evaluated for three samples, three parallel measurements for each, over a period of three days. Measurements were performed with the same equipment and reagents, by the same analyst, but with wide temporal variation. Cochran's C test was used in testing the homogeneity of variance (standard deviation). Experimental values of peak areas (S, $\mu\text{V}\times\text{s}$) and retention times (RT, min) with calculated values of standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) are presented in Table 2 and Table 3, respectively.

2.6.4 Accuracy

The accuracy of the procedure was evaluated by comparing the measured and actual concentrations of amiodarone in model samples and calculating recovery rate. Recovery was calculated for four levels of concentration in the range from 40 % to 200 % of the average therapeutic concentration of amiodarone in human plasma (Table 4).

2.6.5 Robustness

The parameters used for robustness study were change of NaCl mass (± 0.05 g) and change of pH of mobile phase A (± 5). Three different model plasma samples were prepared to test the first listed parameter (Table 6). To study the effect of mobile phase molarity, retention times of AMI was registered in same HPLC conditions, using two buffers (10 μ M and 5 μ M) as mobile phase A. Related chromatograms are presented in Figure 2 and Figure 3, respectively.

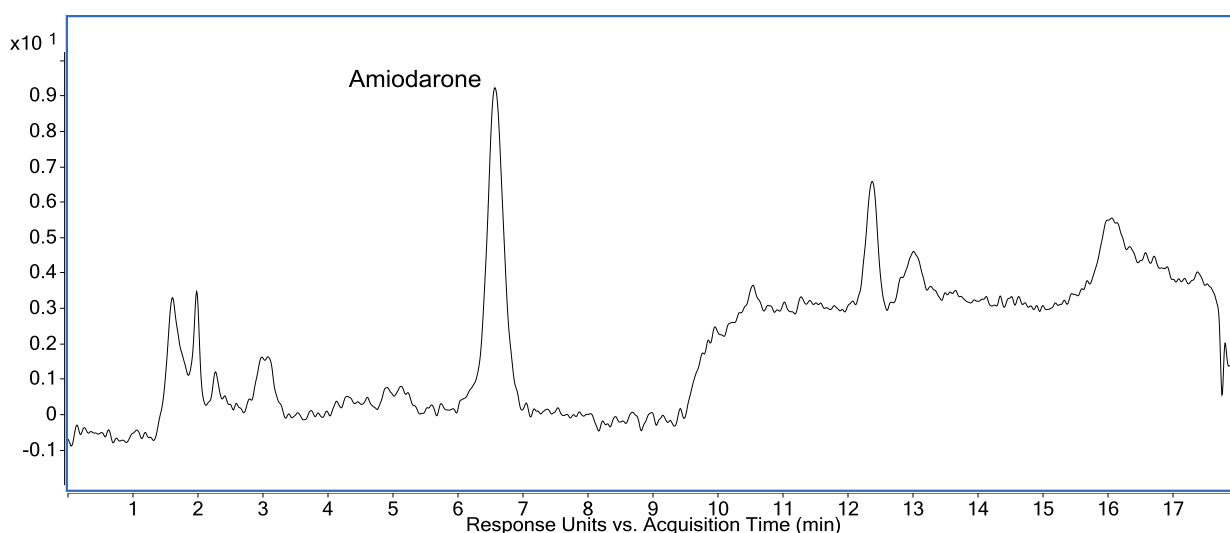


Fig. 2. Chromatogram of model plasma sample (5 μ M buffer)

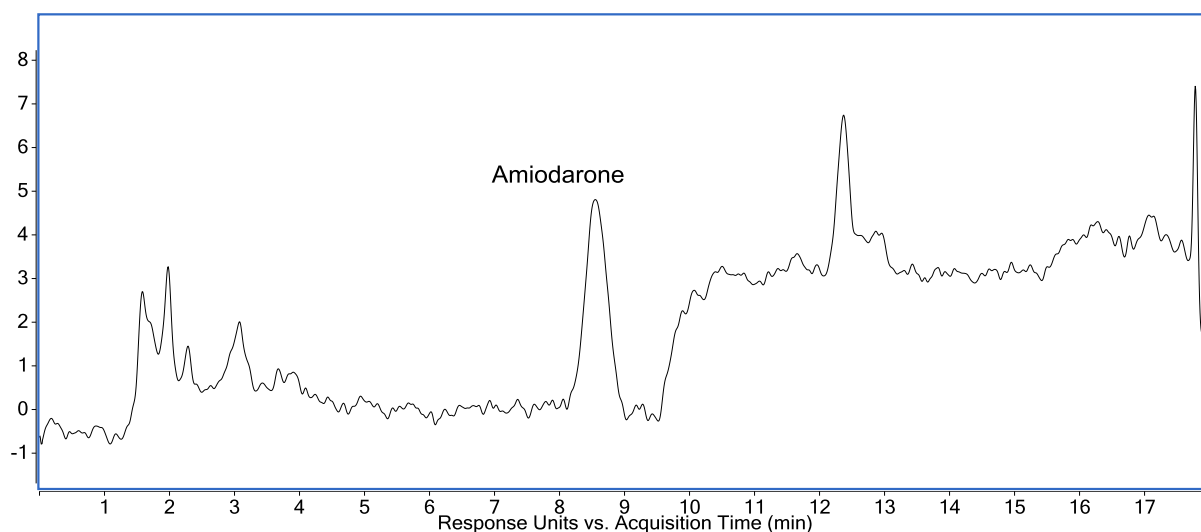


Fig. 3. Chromatogram of model plasma sample (10 μ M buffer)

3. Results

3.1 Specificity

During the specificity study, the ability to qualify AMI and DEA without mass-spectrometry detector had been proved. The use of the Tsunami C₁₈ Pharm column made it possible to achieve elution of peptides in dead time by an exclusion mechanism, while the analytes were retained by a reverse-phase mechanism. Thus, optimal chromatographic conditions were developed to eliminate the influence of protein components of the biological matrix.

The procedure proved to be specific and shows absence of drug interference, as well as absence of interfering coelution of analytes with components of blood plasma matrix. Calculated resolution values for each critical pairs were more than 1.5 and listed in Table 2. The obtained values were within the acceptable range; thus, the developed procedure can be considered suitable according to the specificity parameter.

Related chromatogram of the drugs standard solutions in developed HPLC conditions is presented in Figure 4.

Table 2. Resolution values

Pair	Resolution (R_s)
Amiodarone-Desethylamiodarone	65.2
Amiodarone-Ibuprofen	50.1
Desethylamiodarone-Caffeine/Drotaverine	16.5

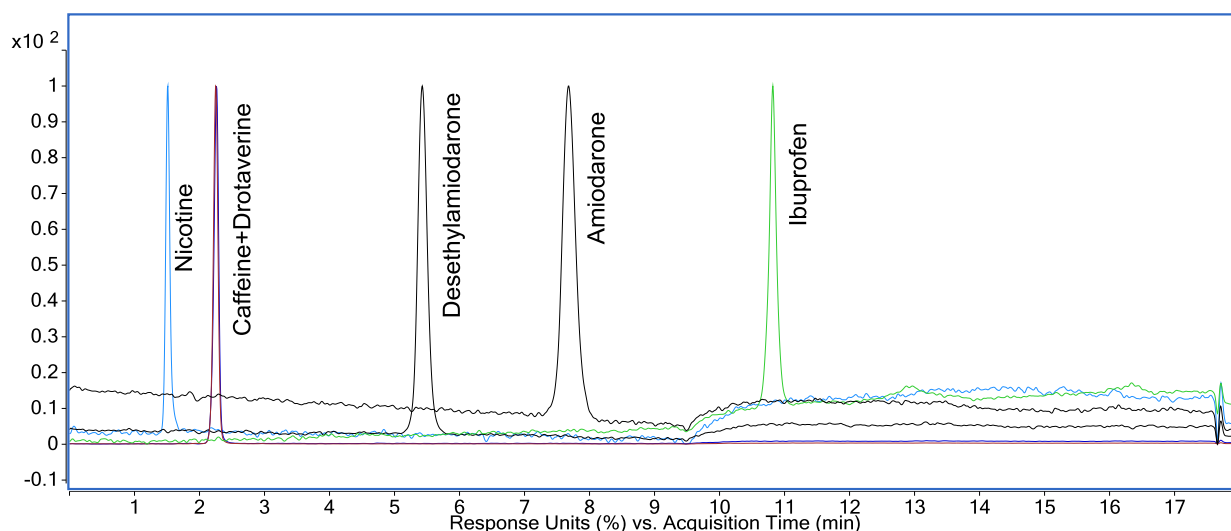


Fig. 4. Overlay chromatogram of drugs used for specificity study

3.2 Linearity

According to the obtained data, the procedure can be considered linear in the concentration range from 0.5 to 3.0 $\mu\text{g/L}$ (40 to 240% of the average therapeutic concentration). The value of the correlation coefficient (R^2) was 0.9975. Thus, since the R^2 values satisfy the condition $R^2 > 0.99$, the procedure can be considered suitable according to the linearity criterion. Based on the proven linearity of the procedure, the limit of quantification and limit of detection were calculated; LOD value was 0.30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($S/N = 3$) and LOQ is equal 0.82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

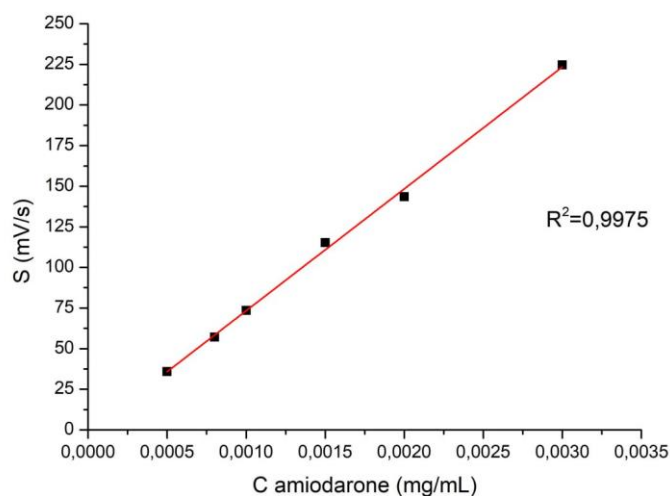


Fig. 5. Calibration curve obtained with the average peak areas of amiodarone in model samples with different concentrations of the drug (0.5; 0.8; 1.0; 1.25; 2.5; 3.0 µg/L)

The quantification of DEA in the sample is calculated according to Formula 1, using the calibration curve for the model mixture of AMI and the response factor for DEA.

$$C_D = \frac{S_A - b}{a} \times F \quad (1)$$

where:

C_D — DEA concentration, µg/L;

S_A — AMI peak area, µV×s;

a, b — linearity equation coefficients;

F — response factor for DEA.

The described technique allows to calculate the plasma concentration of DEA without constructing a calibration curve for the metabolite.

3.3 Precision (repeatability and intermediate precision)

The experimental value of Cochran's C – criterion for retention time of amiodarone was 0.387; for peak area – 0.561. Theoretical value of Cochran's C – criterion, for the confidence level equal to 0.95, was 0.871 according to the Russian Federation System for Ensuring Uniformity of Measurements (Recommendations on Interstate Standardization 61 – 2010).

$$G_{\text{EXP}} (RT) = 0.387;$$

$$G_{\text{EXP}} (S) = 0.561;$$

$$G_{\text{THEOR}} = 0.871$$

The experimental values of Cochran's C – criteria are less than the theoretical one. Therefore, the dispersions can be considered homogeneous and averaged to calculate the SD of repeatability of the method.

As can be seen from the calculation results (Table 3), % RSD values of repeatability and intermediate precision meet the established requirements (less than 5% and 10%, respectively). Consequently, the developed procedure can be considered suitable within the analytical area.

Table 3. Precision study on peak area and retention time – repeatability and intermediate precision

Sample	Peak area, $\mu\text{V}\times\text{s}$	Retention time, min
Sample 1	115.33	7.56
Sample 2	115.27	7.76
Sample 3	115.29	7.85
Sample 4	114.91	7.52
Sample 5	115.34	7.66
Sample 6	114.81	7.71
Sample 7	117.86	7.55
Sample 8	115.49	7.68
Sample 9	121.71	7.76
Sample 10	105.76	7.70
Sample 11	113.84	7.89
Sample 12	115.00	7.93
Mean	115.05	7.71
Repeatability SD	3.974	0.119
Repeatability %RSD	3.47	1.55
Intermediate precision SD	2.985	0.091
Intermediate precision %RSD	2.61	1.18

3.4 Accuracy

The obtained values of deviations of measured concentrations from the actual value in the range from 40% to 200% of the average therapeutic concentration are within the range of acceptable (Table 4). Thus, the developed procedure can be considered accurate in the considered range of concentrations.

Table 4. Recovery rate

Level	RSD. %	Mean % Recovery
-------	--------	-----------------

40%	3.49	84.02
100%	2.07	91.92
130%	3.54	90.97
200%	0.70	85.06

3.5 Robustness

The calculated data did not indicate a significant change in the degree of extraction of amiodarone with a change in the mass of NaCl. The recovery level for all samples, used for this study, was above 99% (Table 4).

Robustness was also assessed by varying the pH of the mobile phase. Plasma samples were analyzed at pH values of 2.5 and 3.5. The results showed an overlap of the AMI peak with the peak of the biological matrix component at pH 2.5, as well as a change in retention time (RT = 6.22). At pH 3.5, the analyte peak was characterized by an increase in retention time (RT = 8.16) and broadening (Fig. 4). Thus, the method exhibits low robustness values for a number of chromatographic parameters and requires precise adherence to the sample preparation procedure and mobile phase preparation.

Table 5. Effect of NaCl mass on amiodarone recovery

NaCl mass, g	Mean peak area, $\mu V \times s$	% Recovery
0.33	115.33	100.0
0.28	115.21	99.9
0.38	115.10	99.8

4. Discussion

Attempts to personalize amiodarone therapy and identify the correlation between its concentration and the efficacy and safety of treatment have been made repeatedly. The method of inverse voltamperometry is quite sensitive and allows for the determination of amiodarone levels at 0.01 mg/ml. However, a significant drawback is that the conditions were developed for substance solutions and do not account for the presence of blood components in the sample; therefore, this methodology cannot be used to determine amiodarone in blood plasma. An

alternative method is based on spectrophotometric analysis of chloroform extracts of the ion associate of amiodarone and methyl orange from an acetate buffer solution at pH 3, at a wavelength of 430 nm. Its drawback is its unsuitability for the assessment of biological samples, as the methodology does not consider the matrix effects of plasma components and the potential formation of ion associates with other small molecules that possess positively charged functional groups. Moreover, the limit of quantification of amiodarone for the described analytical method is 0.34 mg/ml, which is more than 100 times higher than the therapeutic concentration of amiodarone in blood plasma (1.0–2.5 µg/ml). The method for determining amiodarone in serum by liquid tandem chromato-mass-spectrometry is more selective and sensitive compared to photometric and amperometric methods. However, this method is relatively expensive due to the high costs of reagents, standards, and equipment. Another downside is the sample preparation time: the preparation time for a single sample exceeds 20 minutes. The method described in the article by T. Pérez-Ruiz et al. [11] is based on determining amiodarone using high-performance liquid chromatography with a chemiluminescent detector. This method allows for the determination of amiodarone in biological samples but requires a chemiluminescent detector not included in the basic equipment of the chromatograph, as well as the use of expensive reagents, which poses a significant limitation for its routine use. An alternative method is described in the article by Márcio Rodrigues et al. [12]. For quantitative analysis, the method employs high-performance liquid chromatography using a UV detector. The sample preparation procedure involves adding an internal standard and phosphate buffer at pH 5, followed by triple extraction of AMI with n-hexane, complete drying of the combined extract under a nitrogen stream at 60°C, and re-dissolving the dry residue in methanol. Chromatographic separation is performed on a Purospher Star C18 column with 55mm×4mm×4µm geometry in isocratic mode with solution of 0.1% formic acid/methanol/acetonitrile (45:5:50, v/v/v) at a flow rate of 1.2 ml/min. The detection wavelength is 254 nm, and the injection volume is 20 µl. The limit of quantification for the components is 0.1 µg/ml. This method is the most similar in technical essence and achievable results to the one

developed by the authors. However, its disadvantages include a long sample preparation process and the need for additional equipment: a nitrogen concentrator and a liquid chromatograph, the pump of which should operate at pressures ranging from 700 to 1000 bar.

The novelty of the proposed method:

1) The sample preparation features based on the QuEChERS method, which ensures the significant reduction of plasma protein interference in chromatographic analysis;

2) The specific chromatographic conditions of gradient elution using a proprietary Tsunami C18 Pharm column at a flow rate of 1.2 ml/min, with an injection volume of 80 μ l, a detection wavelength of 241 nm in a total analysis time of 18 minutes.

The application of these new conditions eliminates the interfering effects of blood plasma proteins, confirming the feasibility of quantitative determining of AMI using high-performance liquid chromatography-ultrafiltration, without utilizing a mass spectrometric detector. The absence of analogous method in routine clinical practice, coupled with the relatively high speed of analysis implementation, would allow us to consider clinical research to evaluate AMI concentrations in the treatment of arrhythmias, with subsequent integration into healthcare practice. This would create opportunities for studying the patterns of AMI effects in patients with arrhythmias, as well as for forming a controlled and personalized approach to the treatment of patients with arrhythmic profiles.

5. Conclusions

The new HPLC procedure, based on ultraviolet-detection of analytes, has been developed for quantitative identification of AMI and DEA in human blood plasma. The procedure shows suitability by the parameters of specificity, linearity, accuracy and precision, and was validated as per OFS.1.1.0012.15 “Validation of Analytical Methods”. Although, the developed procedure is characterized by high sensitivity to

changes in the molarity of mobile phase, it can be employed in routine pharmacological control of AMI and DEA in blood plasma of treated patients.

CRediT authorship contribution statement:

Popov S. V. and Batalov R. E. proposed the concept of the study and developed its protocol; Kurgachev D. A., Gorn E. A. and Kazantseva K. I. developed and validated the HPLC method. Sitkova E. S., Dragunova M. A. and Moskovskih T. V. collected the material and prepared the samples; Sitkova E. S. wrote the first version of the manuscript. Krivolapov S. N. contributed to the revision of the original version of the manuscript and translated the text into English;

All authors have been involved in revising it critically for important intellectual content. All authors give final approval of the version to be published. All authors have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to its accuracy or integrity.

References

1. Connolly S.J. Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation*. 1999;100(19):2025–2034. <https://doi.org/10.1161/01.cir.100.19.2025>
2. Shubik Yu.V., Medvedev M.M., Mikhaylov E.N. et al. Management of atrial fibrillation in Russia: real clinical practice and current clinical guidelines. *Journal of Arrhythmology*. 2021;28(2):55-63. <https://doi.org/10.35336/VA-2021-2-55-63>
3. Tatarsky B.A., Kazennova N.V. Chronic kidney disease and atrial fibrillation: approaches to the choice of antiarrhythmic therapy. *Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2023;38(4):20-28. (In Russ.) <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-20-28>
4. O'Bryan L.J., Redfern O.C., Bedford J., Petrinic T., Young J.D., Watkinson P.J. Managing new-onset atrial fibrillation in critically ill patients: a systematic narrative review. *BMJ Open*. 2020;10(3):e034774. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-034774>

5. Holt D.W., Tucker G.T., Jackson P.R. Storey G.C. Amiodarone pharmacokinetics. *Am. Heart J.* 1983;106(4 Pt 2):840–847. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(83\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(83)90006-6)
6. Adams P.C., Holt D.W., Storey G.C., Morley A.R., Callaghan J., Campbell R.W. Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation.* 1985;72(5):1064–1075. <https://doi.org/10.1161/01.cir.72.5.1064>
7. Nattel S., Talajic M., Fermini B., Roy D. Amiodarone: Pharmacology, clinical actions, and relationships between them. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1992;3(3):266–280. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1992.tb00972.x>
8. Connolly S.J. Effect of prophylactic amiodarone on mortality after acute myocardial infarction and in congestive heart failure: meta-analysis of individual data from 6500 patients in randomised trials. Amiodarone trials meta-analysis investigators. *Lancet (London, England).* 1997;350(9089):1417–1424. PMID: 9371164
9. Shenthara J., Rachaiyah J.M., Pillai V., Chakali S.S., Balasubramanian V., Chollenhalli Nanjappa M. Incidence of drug-induced torsades de pointes with intravenous amiodarone. *Indian Heart J.* 2017;69(6):707–713. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.05.024>
10. Hohnloser S.H., Klingenhöfen T., Singh B.N. Amiodarone-associated proarrhythmic effects. A review with special reference to torsade de pointes tachycardia. *Ann. Intern. Med.* 1994;121(7):529–535. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-121-7-199410010-00009>
11. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., García-Martínez M.D. Simultaneous determination of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone by high-performance liquid chromatography with chemiluminescent detection. *Anal. Chim. Acta.* 2008;623(1):89–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.003>
12. Rodrigues M., Alves G., Ferreira A., Queiroz J., Falcão A. A rapid HPLC method for the simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite in rat

- plasma and tissues: a useful tool for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. Sci.* 2013;51(4):361–370. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms149>
13. Tieleman R.G., Gosselink A.T., Crijns H.J., van Gelder I.C., van den Berg M.P., de Kam P.J. et al. Efficacy, safety, and determinants of conversion of atrial fibrillation and flutter with oral amiodarone. *Am. J. Cardiol.* 1997;79(1):53–57. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(96\)00675-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(96)00675-3)
 14. Mostow N.D., Vrobel T.R., Noon D., Rakita L. Rapid suppression of complex ventricular arrhythmias with high-dose oral amiodarone. *Circulation.* 1986;73(6):1231–1238. <https://doi.org/10.1161/01.cir.73.6.1231>
 15. Rotmensch H.H., Swanson B.N., Greenspon A.J., Shoshani D., Greenspan A.M. Amiodarone: individualizing dosage with serum concentrations. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 1983;6(6):1327–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1983.tb04475.x>
 16. Haffajee C.I., Love J.C., Canada A.T., Lesko L.J., Asdourian G., Alpert J.S. et al. Clinical pharmacokinetics and efficacy of amiodarone for refractory tachyarrhythmias. *Circulation.* 1983;67(6):1347–1355. <https://doi.org/10.1161/01.cir.67.6.1347>
 17. Debbas N.M., du Cailar C., Bexton R.S., Demaille J.G., Camm A.J., Puech P. The QT interval: a predictor of the plasma and myocardial concentrations of amiodarone. *Br. Heart J.* 1984;51(3):316–320. <https://doi.org/10.1136/hrt.51.3.316>

Information on author contributions

Popov S.V. and Batalov R.E. proposed the study concept and developed the protocol; Kurgachev D.A., Gorn E.A., and Kazantseva K.I. developed and validated the HPLC method. Sitkova E.S., Dragunova M.A., and Moskovskikh T.V. collected the material and prepared the samples; Sitkova E.S. wrote the first version of the manuscript. Krivolapov S.N. contributed to the revision of the original manuscript and translated the text into English;

All authors were involved in critical revision for important intellectual content. All authors gave final approval of the version to be published. All authors were sufficiently involved in the work to accept public responsibility for relevant portions of the content and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that no questions related to its accuracy or integrity arise.

Conflict of interest: the authors do not declare a conflict of interest.

Information about the authors

Ekaterina S. Sitkova, Cand. Sci. (Med.), head of laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: chekruzhova@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0988-3642>.

Roman E. Batalov, Dr. Sci. (Med.), leading research fellow, laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: romancer@rambler.ru; <http://orcid.org/0000-0003-1415-3932>.

Dmitrii A. Kurgachev, Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, Deputy Head of the Laboratory of physical-chemical analytical methods, The National Research Tomsk State University, e-mail: Kurgachev.tsu@gmail.com;

Ekaterina A. Gorn, research engineer, Laboratory of Supercritical Fluid Research and Application in Agrobiotechnology, The National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia, e-mail: kataask12@gmail.com;

Kseniya I. Kazantceva, laboratory assistant, Laboratory of Supercritical Fluid Research and Application in Agrobiotechnology, The National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia, e-mail: xenia.caz@yandex.ru;

Marina A. Dragunova, Cand. Sci. (Med.), researcher, laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: kirsay@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-7264-9904>.

Sergei N. Krivolapov, interventional electrophysiologist, department of Surgical Arrhythmology and Cardiac Pacing, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: cardiorhythm@mail.ru.

Tatyana V. Moskovskich, Cand. Sci. (Med.), junior researcher, Laboratory of Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: moskovskih_tanya@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-8689-8493>.

Sergey V. Popov, Dr. Sci. (Med.), professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia, e-mail: svp@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-1607-1482>.

Received 23.06.2025;
review received 08.08.2025;
accepted for publication 27.08.2025.

УДК

Ситкова Екатерина Сергеевна, e-mail: chekrzhova@mail.ru.

Тел. +79234263806.

Разработка ВЭЖХ-методики определения амиодарона и дезэтиламиодарона в плазме крови человека

Ситкова Е.С.¹, Баталов Р.Е.¹, Кургачев Д.А.², Горн Е.А.², Казанцева К.И.², Драгунова М.А.¹, Криволапов С.Н.¹, Московских Т.В.¹, Попов С.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИИ кардиологии Томского НИМЦ), 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ), Российская Федерация, 634050, Томск, пр. Ленина, 36

Аннотация

Актуальность. Амиодарон широко используется в качестве антиаритмического препарата, однако его эффективность не всегда предсказуема, а побочные эффекты не полностью контролируемы. Для определения эффективной концентрации амиодарона в крови необходима разработка методики количественного анализа препарата в присутствии биологической матрицы.

Цель. Разработать методику количественного определения амиодарона (АМИ) и дезэтиламиодарона (ДЭА) в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материал и методы. Метод разработан с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity (Agilent, США) с использованием диодно-матричного детектора на экспериментальном образце колонки Tsunami C18 Pharm (250×4,6 mm, 5 µm) в условиях градиентного элюирования. Для защиты колонки от механических воздействий применялась предколонка Agilent Zorbax SB C8 (9,4×15 mm, 7 µm). Валидация проведена в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методов» для следующих параметров: селективность, матричный эффект, линейность, точность, прецизионность, стабильность и предел количественного определения и обнаружения.

Результаты. Пробоподготовка по методу QuEChERS была модифицирована для достижения оптимальных условий для извлечения АМИ и ДЭА из биологической матрицы. В качестве подвижной фазы А использовался буферный фосфат (pH 3, 7,5 mM), подвижной фазы В – 100% ацетонитрил. Режим элюирования – градиентный. До 7,00 мин содержание фазы В составляло 55%, затем с 7,00 до 7,15 мин наблюдалось увеличение содержания фазы В до 85% с целью элюирования более гидрофобных компонентов. С 7,15 до 15,00 мин содержание фазы В не изменялось, а затем возвращалось к исходным 50% на 15,15 мин. Суммарное время анализа составило 18 мин; температура термостата – 30 °С; скорость потока – 1,2 мл/мин; объем инъекции – 80 мкл; длина волны детектирования – 241 нм. Значение мешающего фактора для АМИ составило 2,25, для ДЭА – 1,44.

Выводы. Авторами разработан и валидирован новый способ количественного определения АМИ и ДЭА в плазме крови человека.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; амиодарон; дезэтиламиодарон; плазма человек; разработка методики.

Финансирование: исследование было выполнено при поддержке НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия.

Соблюдение этических норм: исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия (протокол № 240 от 15.02.2023).

Для цитирования: Ситкова Е.С., Баталов Р.Е., Кургачев Д.А., Горн Е.А., Казанцева К.И., Драгунова М.А., Криволапов С.Н., Московских Т.В., Попов С.В. Разработка ВЭЖХ-методики определения амиодарона и дезэтиламиодарона в плазме крови человека. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.*

6. Введение

Амиодарон (АМИ) является высокоэффективным средством для лечения и профилактики аритмий, отнесенным к III классу антиаритмических

препаратов. Помимо блокады калиевого тока, оказывает угнетающее действие на натриевый ток, медленный входящий кальциевый ток, неконкурентно блокирует альфа- и бета-адренорецепторы, ингибирует многочисленные ионные токи, холинергические рецепторы. На сегодняшний день при необходимости назначения антиаритмической терапии свой выбор в пользу АМИ делают 24,1% врачей в США, 34,5% – в Европе и 73,8% – в Латинской Америке [1]. В России по результатам проведенного опроса при органическом поражении миокарда в тактике удержания синусового ритма при фибрилляции предсердий АМИ назначается в 41,2% случаев в качестве препарата первой линии и 51,9% – в качестве терапии второй линии [2, 3].

Эффективность АМИ доказана в терапии большинства сердечных аритмий, включая экстрасистолы любого происхождения, все виды суправентрикулярных тахикардий, пароксизмальную фибрилляцию и трепетание предсердий, пароксизмальные тахикардии у больных с синдромами предвозбуждения желудочков, коронарогенных и большинстве некоронарогенных желудочковых тахикардий, реализуя как первичную, так и вторичную профилактику внезапной сердечной смерти. По результатам систематического обзора эффективность АМИ в удержании синусового ритма варьировала от 30 до 95,2% [4].

Фармакокинетика АМИ уникальна и непростая, обусловлена его высокой липофильностью и практически полным связыванием с белками плазмы, а также большим распределением его в ткани (жировой ткани, печени, легких, надпочечниках, яичках, лимфатических узлах, коже) [5, 6]. Метаболизируется АМИ в печени с участием цитохрома Р450 с образованием основного метаболита дезэтиламиодарона (ДЭА). Последний, в свою очередь, является фармакологически активным и способен усиливать терапевтические эффекты основного соединения [7]. В мета-анализе 13 рандомизированных контролируемых исследований проанализирована частота развития побочных эффектов АМИ, среди которых дисфункция щитовидной железы (гипотиреоз в 6%, гипертиреоз в 0,9%), поражение легких – 1%, печени – 0,6%,

периферические нейропатии – 0,3% [8], развитие полиморфной желудочковой тахикардии – не более 1,5% [9, 10].

Серьезную проблему аритмологии представляет тот факт, что антиаритмические препараты являются фармакологической группой с узким терапевтическим окном, что сопряжено с объективными проблемами их дозирования: даже незначительные изменения их фармакокинетики, приводящие к изменениям концентрации активного вещества в крови, могут приводить как к снижению эффективности, так и к повышению токсичности. Учитывая большое количество дженерических препаратов, представленных на фармакологическом рынке, этот вопрос является крайне важным. Поскольку измерение АМИ и его метаболитов в сыворотке не является стандартной клинической практикой, эффекты перехода между оригинальным и дженерическим препаратом и обратно или между дженерическими препаратами АМИ могут проявиться через несколько недель, что в условиях рутинного наблюдения пациента остается без должного внимания.

Ранее предпринимались попытки по применению различных аналитических методов для количественного определения АМИ в фармацевтических препаратах, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), высокоэффективную тонкослойную хроматографию (Yang и Fang, 1995), жидкостную хроматографию (Gupta и Connolly, 1984; Geoffriau и соавт., 1992), инфракрасную спектроскопию (Jensen и соавт., 1988), корреляционную спектроскопию (Orkoula и соавт., 2007), флуоресцентную спектроскопию (Mohamed и соавт., 1998), иммуноферментный анализ и электрохимические методы (Saita и соавт., 2002, Ball и соавт., 1996), а также были разработаны методики определения АМИ в биологических образцах методами ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ с хемилюминесцентным и ультрафиолетовым детектированием [11, 12]². Метод ВЭЖХ является наиболее селективным в

² ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.;2023: электронный ресурс. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya/> (06.10.2025).

сравнении с ранее описанными методами и обладает высокой чувствительностью. Именно поэтому он был выбран для разработки авторами статьи.

Большая степень изменчивости, наблюдаемая в фармакокинетике АМИ, затрудняет оптимальное его дозирование для отдельного пациента. Попытки персонализировать терапию АМИ и выявить корреляцию его концентрации и концентрации ДЭА с эффективностью и безопасностью терапии предпринимались неоднократно. Дозозависимые эффекты были описаны не только в медикаментозной кардиоверсии и контроле частоты сердечных сокращений [13–16], но и в развитии побочных эффектов. Вместе с тем, отдельные данные свидетельствуют о том, что достижение целевой терапевтической концентрации АМИ зачастую не сопровождается развитием ожидаемого клинического эффекта [17]. Ни одна из используемых в исследованиях методик определения концентрации так и не вошла в рутинное использование в клинической практике, оставляя все возможные перспективы понимания закономерностей эффектов АМИ и персонификации его использования у пациентов нереализованными.

Цель исследования – разработать методику количественного определения АМИ в плазме крови человека методом ВЭЖХ.

Материал и методы

2.1 Дизайн

В процессе разработки методики был решен ряд задач. Во-первых, была модифицирована пробоподготовка по методу QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe — Быстрый, Простой, Дешевый, Эффективный, Точный и Надежный) для достижения оптимальных условий извлечения АМИ и ДЭА из биологической матрицы. Во-вторых, для достижения необходимой специфичности были разработаны условия хроматографического анализа. Финальным шагом стала оценка пригодности разработанной методики для

количественного определения препарата в плазме крови по критериям специфичности, правильности, линейности, повторяемости и промежуточной прецизионности.

2.2 Оборудование

Процедура была разработана с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором (Agilent, США) на колонке Tsunami C₁₈ Pharm column (250×4,6 мм, 5 мкм) в условиях градиентного элюирования. Предколонка Agilent Zorbax SB C₈ (9,4×15 мм, 7 мкм) была использована для защиты колонки от механического загрязнения. Центрифуга CLn-16 (Xiangzhi Centrifuge Instrument Co., Ltd, Китай), аналитические весы GR-200 (AND, Япония), центрифуга ELMi CM-50 (ELMI, США), ультразвуковая ванна Elmasonic P (Elma, Германия), механические дозаторы 200–1000 мкл and 50–200 мкл (Eppendorf, США), Вортекс IKA Vortex Genius 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия), пробирки Эппендорф на 1,5 мл (Minimed, Россия), и прозрачные стеклянные виалы для хроматографии (Interlab, Россия) были использованы во время пробоподготовки.

2.3 Реактивы

Хлорид натрия (lab grade, Minimed, Россия) и ацетонитрил (HPLC-grade, PanReac, Испания) использованы для осаждения белков и извлечения аналитов.

2.4. Пробоподготовка

2.4.1 Приготовление стандартного раствора

Стандартные образцы АМИ (концентрат для приготовления раствора для в/в введения 50 мг/мл), активные субстанции кофеина (Organica, Россия), ибупрофена (Organica, Россия), никотина (Sigma Aldrich) и дротаверина гидрохлорида (Organica, Россия); плацебо (образцы крови здорового добровольца), стандартные образцы АМИ (Clearsynth, Мумбай, Индия, 50 мг) и

ДЭА (Clearsynth, Мумбай, Индия, 10 мг) были использованы для разработки и валидации методики.

2.4.2 Приготовление модельных растворов

В качестве растворителя использована смесь ацетонитрила и фосфатного буфера в объемном соотношении (50:50).

Предварительно готовились рабочие растворы АМИ и ДЭА для внесения добавки в образцы крови здорового добровольца. В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносилось 5 мг АМИ и ДЭА, раствор доводился до метки растворителем и перемешивался.

Пробоподготовка модельных растворов осуществлялась по методу QuEChERS. Кровь из периферической вены пациента забиралась в стерильные пробирки с ЭДТА 6–9 мл, центрифугировалась в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин с последующим отбором 450 мкл плазмы крови и переносом в эппендорф на 1,5 мл. Далее производилось последовательное добавление к плазме 50 мкл градуировочных растворов АМИ и ДЭА (концентрация равна 0,5; 0,8; 1,25; 1,6; 2,5 мг/л), $0,33 \pm 0,04$ г хлорида натрия и 500 мкл экстрагента ацетонитрила с последующим вортексированием в течение 10 секунд на максимальной частоте и центрифугированием эппендорфа в течение 5 мин на максимальных оборотах (15 тыс. в мин) и отбором супернатанта (находится над слоем осевшего на границе расслоения жидкостей белка) с последующим переносом содержимого в вialу со вставкой и ВЭЖХ-анализом.

2.4.3 Приготовление реальных образцов

Кровь из периферической вены пациента, получающего терапию АМИ, забиралась в стерильные пробирки с ЭДТА 6–9 мл, центрифугировалась в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин с последующим отбором 500 мкл плазмы крови и переносом в эппендорф на 1,5 мл. Далее производилось последовательное добавление к плазме $0,33 \pm 0,04$ г хлорида натрия и 500 мкл экстрагента ацетонитрила с последующим вортексированием в течение

10 секунд на максимальной частоте и центрифугированием эппендорфа в течение 5 мин на максимальных оборотах (15 тыс. в мин) и отбором надосадочной жидкости. Образцы плазмы без АМИ были собраны у здоровых пациентов с использованием того же алгоритма подготовки.

2.5 Условия анализа ВЭЖХ

Анализ проводился методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектора. Для исследования использовалась колонка Tsunami C18 Pharm, разработанная в Лаборатории физико-химических методов анализа Томского государственного университета. Подвижная фаза А – фосфатный буфер (рН 3, 7,5 мМ), подвижная фаза В – 100% ацетонитрил. Режим элюирования – градиентный. Программа градиента: до 7,00 мин содержание фазы В составляло 55 %, затем с 7,00 до 7,15 мин содержание фазы В увеличивалось до 85 % с целью элюирования более гидрофобных компонентов. С 7,15 до 15,00 мин содержание фазы В не изменялось, а затем возвращалось к исходным 50% на 15,15 мин. Суммарное время анализа составило 18 мин. Температура термостата – 30 °С, скорость потока – 1,2 мл/мин; объем инъекции – 80 мкл; длина волны детектирования – 241 нм. Типичная хроматограмма образца плазмы представлена на рисунке 1. Относительное время удерживания для АМИ составило 5,2, для ДЭА – 3,4.

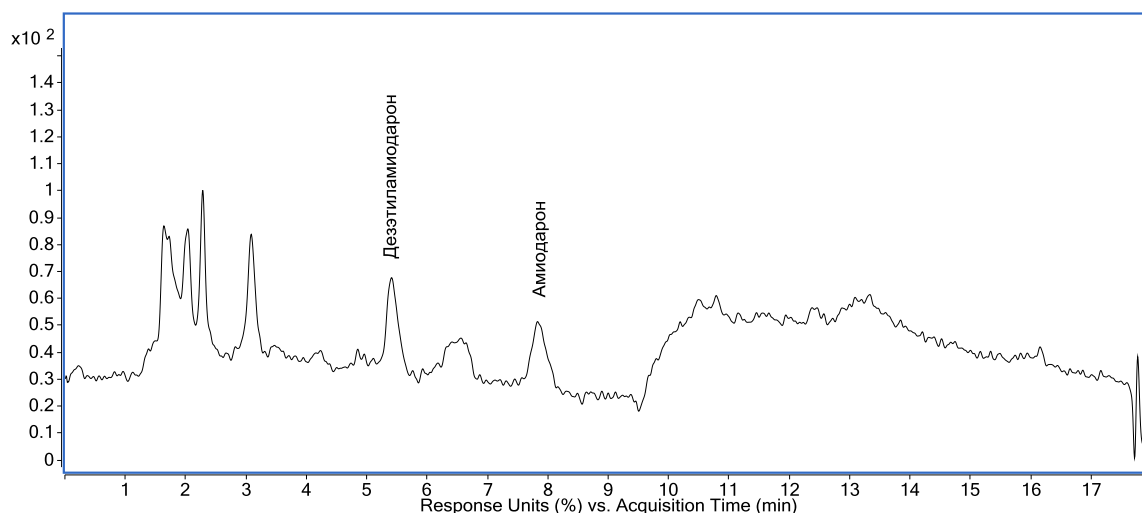


Рис. 1. Типичная хроматограмма образца плазмы, содержащего амиодарон и дезэтиламиодарон

2.6 Валидация

Валидация проводилась на основе ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по следующим параметрам: селективность, матричный эффект (посредством построения калибровочной кривой относительно содержания АМИ в плазме после пробоподготовки для разных уровней концентрации), линейность, точность, прецизионность, стабильность и предел количественного определения и обнаружения. В таблице 1 представлены критерии валидации в соответствии с ОФС.1.1.0012.15.

Таблица 1. Критерии пригодности методики анализа

Показатель	Критерий пригодности методики
Селективность	Разрешение между двумя пиками определяемых веществ и компонентов плазмы крови, нестероидного противовоспалительного препарата, кофеина и никотина не менее 1,5.
Линейность	Коэффициент корреляции линейной зависимости в диапазоне от 50% до 200% терапевтической концентрации амиодарона не менее 0,99.
Повторяемость	% RSD не более 5%
Промежуточная прецизионность	% RSD не более 10%
Правильность	% восстановления от 85% до 115% (от 70% до 130% для уровня предела количественного обнаружения)

2.6.1 Специфичность

Оценивали специфичность методики по отношению к лекарственным веществам, наиболее распространенным в медицинской практике. В эту группу входят нестероидные противовоспалительные средства (Ибупрофен), стимулятор нервной системы (Кофеин), а также спазмолитическое средство

(Дротаверин). Специфичность оценивали также по отношению к основному метаболиту АМИ.

2.6.2 Линейность

Линейность методики оценивали путем построения градуировочной зависимости для стандартных растворов АМИ. Стандартные образцы были приготовлены по методике, описанной ранее, с использованием модифицированной пробоподготовки по методу QuEChERS.

Предварительно готовились рабочие растворы АМИ для внесения добавки в образцы крови здорового добровольца. В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вносилось 5 мг АМИ, раствор доводился до метки растворителем и перемешивался. Из рабочего раствора готовились градуировочные растворы А–Д в диапазоне концентраций 0,005–0,025 мг/мл:

Раствор А. В колбу вместимостью 10,0 мл вносилось 5,0 мл раствора, содержимое доводилось до метки растворителем и перемешивалось. Раствор содержал АМИ в концентрации 0,025 мг/мл.

Раствор Б. В колбу вместимостью 10,0 мл вносилось 3,2 мл раствора, содержимое доводилось до метки растворителем и перемешивалось. Раствор содержал АМИ в концентрации 0,016 мг/мл.

Раствор В. В колбу вместимостью 10,0 мл вносилось 2,5 мл раствора, содержимое доводилось до метки растворителем и перемешивалось. Раствор содержал АМИ в концентрации 0,013 мг/мл.

Раствор Г. В колбу вместимостью 10,0 мл вносилось 1,6 мл раствора, содержимое доводилось до метки растворителем и перемешивалось. Раствор содержал АМИ в концентрации 0,008 мг/мл.

Раствор Д. В колбу вместимостью 10,0 мл вносилось 1,0 мл раствора, содержимое доводилось до метки растворителем и перемешивалось. Раствор содержал АМИ в концентрации 0,005 мг/мл.

Пробоподготовка растворов для проверки линейности осуществлялась по методу QuEChERS. Кровь из периферической вены пациента забиралась в стерильные пробирки с ЭДТА 6-9 мл, центрифугировалась в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин с последующим отбором 450 мкл плазмы крови и переносом в эппендорф на 1,5 мл. Далее производилось последовательное добавление к плазме 50 мкл градуировочных растворов АМИ (концентрация равна 0,5; 0,8; 1,25; 1,6; 2,5 мг/л), $0,33 \pm 0,04$ г хлорида натрия и 500 мкл экстрагента ацетонитрила с последующим вортексированием в течение 10 секунд на максимальной частоте и центрифугированием эппендорфа в течение 5 мин на максимальных оборотах (15 тыс. в мин) и отбором супернатанта (находится над слоем осевшего на границе расслоения жидкостей белка) с последующим переносом содержимого в вials со вставкой и ВЭЖХ-анализом. Построенная градуировочная зависимость представлена на рисунке 5. Линейная зависимость также была получена для ДЭА. На основании данных линий рассчитан фактор отклика (F) для ДЭА относительно АМИ, равный 1,450.

2.6.3 Воспроизводимость (повторяемость и промежуточная прецизионность)

Повторяемость оценивалась путем измерения аналитического сигнала для трех образцов, трех параллельных измерений для каждого образца. Измерения проводились в течение короткого промежутка времени, с использованием одного и того же оборудования и реагентов, одним аналитиком. Промежуточная (внутрилабораторная) точность оценивалась для трех образцов, трех параллельных измерений для каждого, в течение трех дней. Измерения проводились с использованием одного и того же оборудования и реагентов, одним и тем же аналитиком, но с широким временным разбросом. G-критерий Кохрена использовался для проверки однородности дисперсии (стандартное отклонение). Экспериментальные значения площадей пиков (S , мкВ×с) и времени удерживания (RT , мин) с расчетными значениями стандартного

отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (представлены в таблице 2 и таблице 3 соответственно).

2.6.4 Правильность

Точность процедуры оценивалась путем сравнения измеренных и фактических концентраций АМИ в стандартных образцах и расчета скорости восстановления. Восстановление рассчитывалось для четырех уровней концентрации в диапазоне от 40% до 200% от средней терапевтической концентрации АМИ в плазме человека (таблица 4).

2.6.5 Робастность

Параметрами, использованными для исследования надежности, были изменение массы NaCl ($\pm 0,05$ г) и изменение pH подвижной фазы А (± 5). Для проверки первого из перечисленных параметров были подготовлены три различных стандартных образца (таблица 6). Для изучения влияния pH подвижной фазы время удерживания АМИ регистрировали в тех же условиях ВЭЖХ с использованием двух буферов (10 мкМ и 5 мкМ) в качестве подвижной фазы А. Хроматограммы представлены на рисунке 2 и рисунке 3 соответственно.

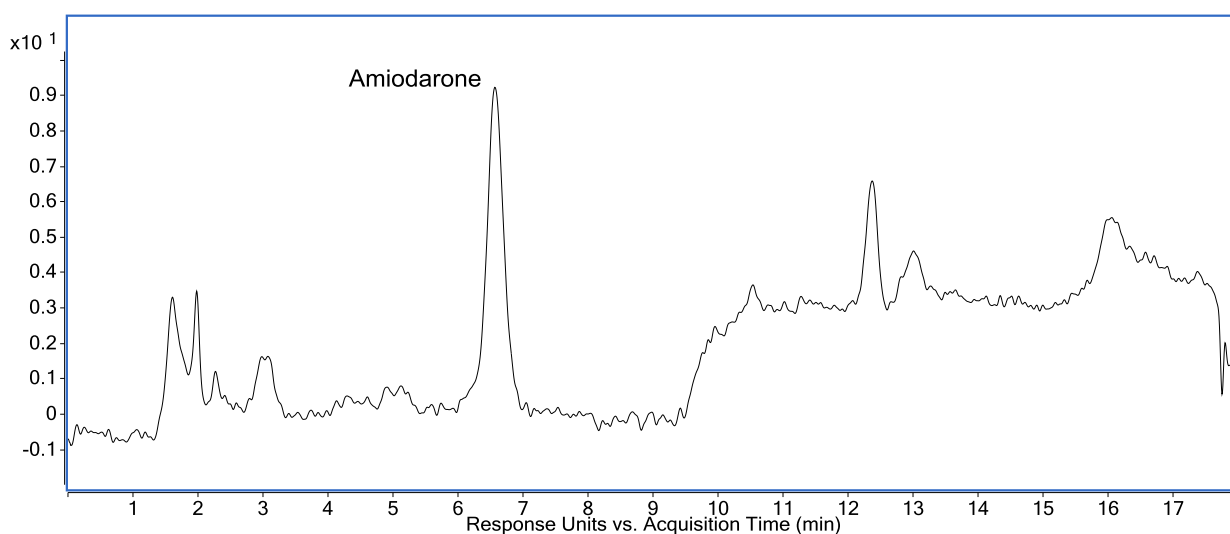


Рис. 2. Хроматограмма стандартного образца (5 мкМ буфер)

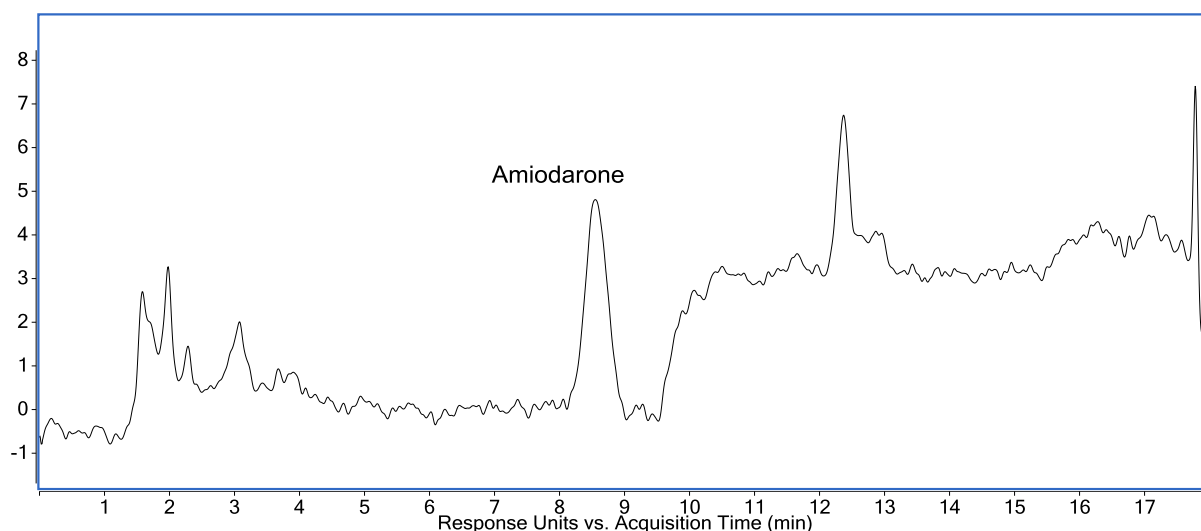


Рис. 3. Хроматограмма стандартного образца (10 мкМ буфер)

3. Результаты

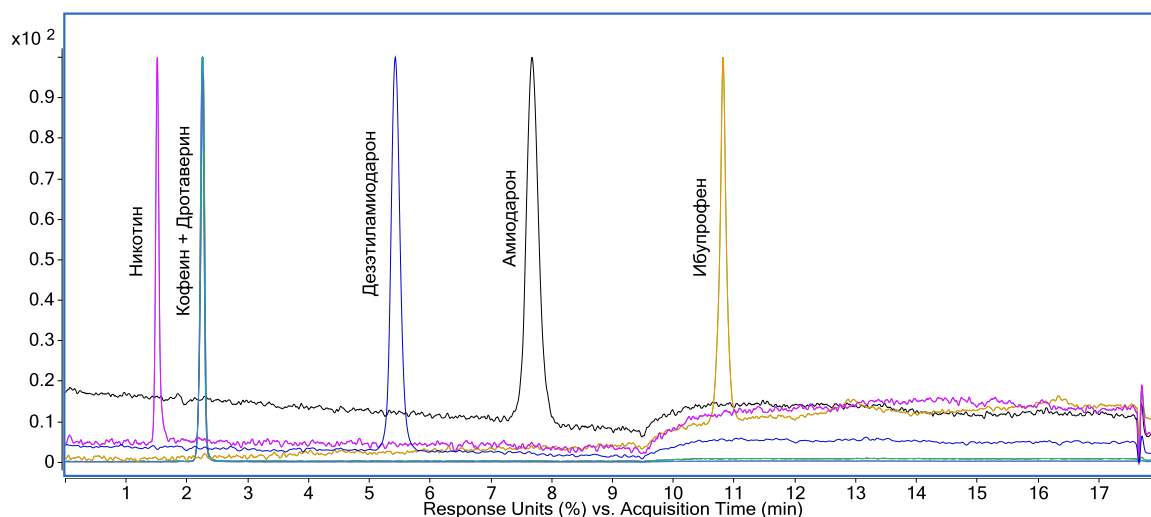
3.1 Специфичность

В ходе исследования специфичности была доказана возможность определения АМИ и ДЭА без масс-спектрометрического детектора. Использование колонки Tsunami C18 Pharm позволило добиться элюирования пептидов по механизму исключения, в то время как аналиты удерживались по механизму обращенной фазы. Таким образом, были разработаны оптимальные хроматографические условия для устранения влияния белковых компонентов биологической матрицы.

В результате была документирована специфичность методики, продемонстрировано отсутствие лекарственной интерференции, а также мешающего коэлюирования аналитов с компонентами матрицы плазмы крови. Расчетные значения разрешения для каждой критической пары составили более 1,5 и приведены в таблице 2. Полученные значения находились в допустимом диапазоне, таким образом, разработанную процедуру можно считать пригодной по параметру специфичности. Соответствующая хроматограмма стандартных растворов лекарственных препаратов в разработанных условиях ВЭЖХ представлена на рисунке 4.

Таблица 2. Значение разрешения

Пара	Разрешение (R_s)
Амиодарон – дезэтиламиодарон	65,2
Амиодарон – Ибупрофен	50,1
Дезэтиламиодарон–Кофеин/Дротаверин	16,5

**Рис. 4.** Хроматограммы стандартных растворов лекарственных средств

3.2 Линейность

Согласно полученным данным, методику можно считать линейной в диапазоне концентраций от 0,5 до 3 мкг/мл (от 40 до 240 % от средней терапевтической концентрации). Величина коэффициента корреляции (R^2) составила 0,9975. Таким образом, поскольку величины R^2 удовлетворяют условию $R^2 > 0,99$, методику можно считать пригодной по критерию линейности. На основании доказанной линейности методики были рассчитаны предел количественного определения и предел обнаружения согласно ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография. Предел обнаружения составил 0,30 мг/мл ($S/N = 3$), предел количественного определения – 0,82 мг/мл.

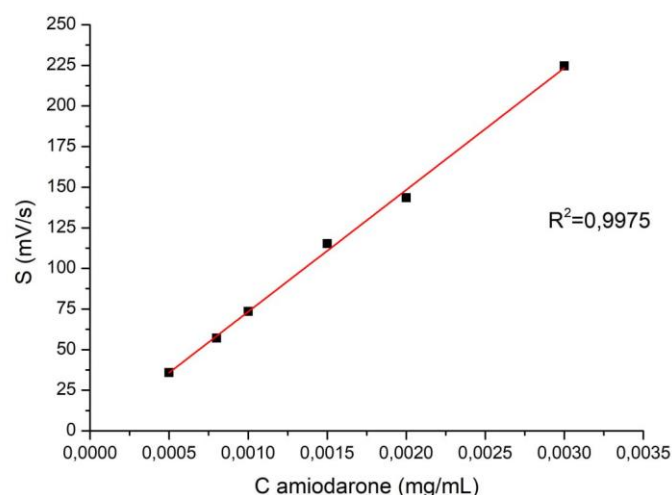


Рис. 5. Градуировочный график для стандартных растворов амиодарона с различным концентрациями препарата (0,5; 0,8; 1,0; 1,25; 2,5; 3,0 мг/л)

Содержание ДЭА в пробе вычисляют по формуле 1, используя градуировочный график для модельной смеси АМИ и фактор отклика для ДЭА.

$$C_D = \frac{S_A - b}{a} \times F \quad (1)$$

где:

C_D – концентрация ДЭА, мл/л;

S_A – площадь пика АМИ, мВ×с;

a, b – Коэффициенты в уравнении линейности;

F – Фактор отклика для ДЭА.

Описанная методика позволяет определять концентрацию ДЭА без построения калибровочной кривой для метаболита.

3.3 Воспроизводимость (повторяемость и промежуточная прецизионность)

Экспериментальное значение G-критерия Кохрена для времени удерживания АМИ составило 0,387, для площади пика – 0,561. Теоретическое значение G-критерия Кохрена для уровня достоверности, равного 0,95,

составило 0,871 согласно Системе обеспечения единства измерений Российской Федерации (Рекомендации по межгосударственной стандартизации 61 – 2010).

$$G_{\text{EXP}}(RT) = 0,387;$$

$$G_{\text{EXP}}(S) = 0,561;$$

$$G_{\text{THEOR}} = 0,871.$$

Экспериментальные значения G-критерия Кохрена меньше табличного, следовательно, дисперсии можно считать однородными и усреднить для расчета СКО повторяемости методики. Как видно из результатов расчета (таблица 3), значения относительного стандартного отклонения (RSD) повторяемости и промежуточной прецизионности соответствуют установленным требованиям (меньше 5% и 10% соответственно). Следовательно, разработанную методику можно считать пригодной в пределах аналитической области.

Таблица 3. Изучение точности площади пика и времени удерживания – повторяемость и промежуточная точность (пробы инжесктированы трижды)

Проба	Площадь пика, мВ×с	Время удерживания, мин
Проба 1	115,33	7,56
Проба 2	115,27	7,76
Проба 3	115,29	7,85
Проба 4	114,91	7,52
Проба 5	115,34	7,66
Проба 6	114,81	7,71
Проба 7	117,86	7,55
Проба 8	115,49	7,68
Проба 9	121,71	7,76
Проба 10	105,76	7,70
Проба 11	113,84	7,89
Проба 12	115,00	7,93
Среднее	115,05	7,71
СКО повторяемости, %	3,97	0,12
RSD повторяемости, %	3,47	1,55
СКО промежуточной прецизионности, %	2,99	0,09
RSD промежуточной	2,61	1,18

прецизионности, %		
-------------------	--	--

3.4 Правильность

Полученные величины отклонений расчетных концентраций от номинального значения в диапазоне от 40 % до 200 % от терапевтической концентрации входят в диапазон приемлемых (таблица 4). Таким образом, разработанную методику можно считать правильной в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Таблица 4. Правильность в условиях повторяемости

%, от средней терапевтической концентрации	RSD, %	Восстановление, %
40%	3,49	84,02
100%	2,07	91,92
130%	3,54	90,97
200%	0,70	85,06

3.5 Робастность

Влияние массы навески NaCl

Расчетные данные свидетельствуют об изменении степени извлечения анализируемого вещества при изменении массы используемой соли на 0,05 г, причем извлечение увеличивается с увеличением массы. Результаты представлены в таблице 4.

Оценку робастности проводили также при изменении pH подвижной фазы. Анализ образцов плазмы проводили при значениях pH, равных 2,5 и 3,5. Результаты анализа показали наложение пика АМИ на пик компонента биологической матрицы для pH 2,5, а также изменение времени удерживания ($RT = 6,22$); при значении pH 3,5, пик анализируемого вещества характеризовался увеличением времени удерживания ($RT = 8,16$) и уширением (рис.4). Таким образом, методика характеризуется низкими значениями робастности по ряду хроматографических параметров, требует точного соблюдения методики пробоподготовки и приготовления подвижных фаз.

Таблица 5. Влияние массы NaCl на извлечение амиодарона

m (NaCl), г	S _{сред} , мВ×с	%, от исходной S
0,33	59,80	100
0,28	57,88	96,79
0,38	61,59	102,99

4. Обсуждение

Попытки персонализировать терапию АМИ и выявить корреляцию его концентрации с эффективностью и безопасностью терапии предпринимались неоднократно. Метод инверсионной вольтамперометрии является достаточно чувствительным и позволяет определять содержание АМИ на уровне 0,01 мг/мл. При этом существенным ее недостатком является тот факт, что условия разработаны для растворов субстанции и не учитывают присутствие компонентов крови в образце, следовательно, методика не может быть использована для определения АМИ в плазме крови.

Альтернативным является метод, основанный на спектрофотометрическом анализе хлороформных экстрактов ионного ассоциата АМИ и метилового оранжевого из ацетатного буферного раствора с pH 3 при длине волны 430 нм. Недостатком является его непригодность для исследования биологических образцов, так как методика не учитывает матричное влияние компонентов плазмы крови и возможность образования ионных ассоциатов с иными малыми молекулами, обладающими положительно заряженными функциональными группами. Помимо этого, предел количественного определения АМИ для описанной методики анализа равен 0,34 мг/мл, что более чем в 100 раз выше терапевтической концентрации АМИ в плазме крови (1,0–2,5 мкг/мл). Способ определения АМИ в сыворотке крови методом жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии является более селективным и чувствительным в сравнении с фотометрическим и амперометрическим. При этом метод достаточно дорогой из-за высокой стоимости реактивов, стандартов и прибора. Недостатком является и время пробоподготовки: время приготовления одного образца составляет более 20 мин.

Способ, описанный в статье T. Pérez-Ruiz и соавт. [11], основан на определении АМИ методом ВЭЖХ с использованием хемилюминесцентного детектора. Данный способ позволяет определять АМИ в биологических образцах, но предполагает использование хемилюминесцентного детектора, не входящего в базовую комплектацию хроматографа, а также использование дорогостоящих реактивов, что является существенным ограничением для его рутинного использования. Альтернативный разработанному авторами способ определения АМИ описан в статье M. Rodrigues и соавт. [12]. Для количественного анализа использован метод ВЭЖХ с использованием УФ-детектора. Методика пробоподготовки включает добавление внутреннего стандарта и фосфатного буфера pH 5 с последующей, полным осушением объединенного экстракта в токе азота при 60°C и перерастворением сухого остатка в метаноле. Хроматографическое разделение проводится на колонке Purospher Star C18 геометрии 55×4 мм; 4 мкм в изократическом режиме смесью 0,1% раствор муравьиной кислоты/метанол/ацетонитрил (45:5:50, v/v/v) при потоке 1,2 мл/мин. Длина волны детектирования – 254 нм, объем инъекции – 20 мкл. Предел количественного определения компонентов – 0,1 мкг/мл.

Данный способ наиболее близкий к разработанному авторами по технической сущности и достигаемому результату. Недостатком способа является длительная пробоподготовка и использование дополнительного оборудования: концентратора азота и жидкостного хроматографа, насос которого рассчитан на работу при давлении в диапазоне 700–1000 бар.

Новым в предлагаемом способе являются:

- 1) особенности пробоподготовки, основанной на методе QuEChERS, обеспечивающей устранение значительного влияния белков плазмы на хроматографический анализ;
- 2) специфика хроматографических условий градиентного элюирования с использованием проприетарной колонки Tsunami C18 Pharm при скорости потока 1,2 мл/мин, объеме инъекции 80 мкл, длине волны детектирования 241 нм при общем времени анализа 18 мин.

Применение новых условий обеспечивает устранение мешающего влияния белков плазмы крови, что подтверждает возможность количественного определения АМИ методом ВЭЖХ-ультрафильтрации, без использования масс-спектрометрического детектора. Отсутствие аналога предлагаемого способа в рутинной клинической практике при сравнительно высокой скорости реализации анализа позволит рассматривать вопрос о проведении клинического исследования оценки концентрации АМИ в терапии нарушений ритма сердца с последующим внедрением его в деятельность учреждений здравоохранения. Это создаст перспективы изучения закономерностей развития эффектов АМИ у пациентов с нарушениями ритма сердца, а также формирования контролируемого и персонализированного подхода к терапии пациентов аритмологического профиля.

Заключение

Разработана ВЭЖХ-методика для количественного определения АМИ и ДЭА в плазме крови человека. Методика показала пригодность по параметрам специфичности, линейности, точности и прецизионности и прошла валидацию в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методов». Несмотря на то, что разработанная методика характеризуется высокой чувствительностью к изменениям pH подвижной фазы, она может быть использована для рутинного определения концентрации АМИ и ДЭА в плазме крови получающего лечение пациента.

Литература

1. Connolly S.J. Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation*. 1999;100(19):2025–2034. <https://doi.org/10.1161/01.cir.100.19.2025>
2. Шубик Ю.В., Медведев М.М., Михайлов Е.Н., Гасимова Н.З., Гиляров М.Ю. Лечение фибрилляции предсердий в России: реальная клиническая практика и рекомендации. *Вестник аритмологии*. 2021;28(2):55–63. <https://doi.org/10.35336/VA-2021-2-55-63>

3. Татарский Б.А., Казеннова Н.В. Хроническая болезнь почек и фибрилляция предсердий: подходы к выбору антиаритмической терапии. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2023;38(4):20–28. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-20-28>
4. O'Bryan L.J., Redfern O.C., Bedford J., Petrinic T., Young J.D., Watkinson P.J. Managing new-onset atrial fibrillation in critically ill patients: a systematic narrative review. *BMJ Open*. 2020;10(3):e034774. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-034774>
5. Holt D.W., Tucker G.T., Jackson P.R. Storey G.C. Amiodarone pharmacokinetics. *Am. Heart J.* 1983;106(4 Pt 2):840–847. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(83\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(83)90006-6)
6. Adams P.C., Holt D.W., Storey G.C., Morley A.R., Callaghan J., Campbell R.W. Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation*. 1985;72(5):1064–1075. <https://doi.org/10.1161/01.cir.72.5.1064>
7. Nattel S., Talajic M., Fermini B., Roy D. Amiodarone: Pharmacology, clinical actions, and relationships between them. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1992;3(3):266–280. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1992.tb00972.x>
8. Connolly S.J. Effect of prophylactic amiodarone on mortality after acute myocardial infarction and in congestive heart failure: meta-analysis of individual data from 6500 patients in randomised trials. Amiodarone trials meta-analysis investigators. *Lancet (London, England)*. 1997;350(9089):1417–1424. PMID: 9371164
9. Shenthathar J., Rachaiah J.M., Pillai V., Chakali S.S., Balasubramanian V., Chollenhalli Nanjappa M. Incidence of drug-induced torsades de pointes with intravenous amiodarone. *Indian Heart J.* 2017;69(6):707–713. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.05.024>
10. Hohnloser S.H., Klingenhöfen T., Singh B.N. Amiodarone-associated proarrhythmic effects. A review with special reference to torsade de pointes

- tachycardia. *Ann. Intern. Med.* 1994;121(7):529–535.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-121-7-199410010-00009>
11. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., García-Martínez M.D. Simultaneous determination of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone by high-performance liquid chromatography with chemiluminescent detection. *Anal. Chim. Acta.* 2008;623(1):89–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.003>
 12. Rodrigues M., Alves G., Ferreira A., Queiroz J., Falcão A. A rapid HPLC method for the simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite in rat plasma and tissues: a useful tool for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. Sci.* 2013;51(4):361–370. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms149>
 13. Tieleman R.G., Gosselink A.T., Crijns H.J., van Gelder I.C., van den Berg M.P., de Kam P.J. et al. Efficacy, safety, and determinants of conversion of atrial fibrillation and flutter with oral amiodarone. *Am. J. Cardiol.* 1997;79(1):53–57. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(96\)00675-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(96)00675-3)
 14. Mostow N.D., Vrobel T.R., Noon D., Rakita L. Rapid suppression of complex ventricular arrhythmias with high-dose oral amiodarone. *Circulation.* 1986;73(6):1231–1238. <https://doi.org/10.1161/01.cir.73.6.1231>
 15. Rotmensch H.H., Swanson B.N., Greenspon A.J., Shoshani D., Greenspan A.M. Amiodarone: individualizing dosage with serum concentrations. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 1983;6(6):1327–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1983.tb04475.x>
 16. Haffajee C.I., Love J.C., Canada A.T., Lesko L.J., Asdourian G., Alpert J.S. et al. Clinical pharmacokinetics and efficacy of amiodarone for refractory tachyarrhythmias. *Circulation.* 1983;67(6):1347–1355.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.67.6.1347>
 17. Debbas N.M., du Cailar C., Bexton R.S., Demaille J.G., Camm A.J., Puech P. The QT interval: a predictor of the plasma and myocardial concentrations of amiodarone. *Br. Heart J.* 1984;51(3):316–320. <https://doi.org/10.1136/hrt.51.3.316>

Popov S.V. and Batalov R.E. proposed the study concept and developed the protocol; Kurgachev D.A., Gorn E.A., and Kazantseva K.I. developed and validated the HPLC method. Sitkova E.S., Dragunova M.A., and Moskovskikh T.V. collected the material and prepared the samples; Sitkova E.S. wrote the first version of the manuscript. Krivolapov S.N. contributed to the revision of the original manuscript and translated the text into English.

All authors were involved in critical revision for important intellectual content. All authors gave final approval of the version to be published. All authors were sufficiently involved in the work to accept public responsibility for relevant portions of the content and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that no questions related to its accuracy or integrity arise.

Conflict of interest: the authors do not declare a conflict of interest.

Information about the authors

Ekaterina S. Sitkova, Cand. Sci. (Med.), senior researcher, laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia; e-mail: chekruzhova@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0988-3642>.

Roman E. Batalov, MD, a head of laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya street 111a, Tomsk, Russian Federation. E-mail: romancer@rambler.ru; <http://orcid.org/0000-0003-1415-3932>.

Dmitrii A. Kurgachev, PhD in Chemistry, senior researcher, Deputy Head of the Laboratory of physical-chemical analytical methods, The National Research Tomsk State University. e-mail: Kurgachev.tsu@gmail.com

Ekaterina A. Gorn, research engineer, Laboratory of Supercritical Fluid Research and Application in Agrobiotechnology, The National Research Tomsk State

University, 36, Lenin Avenue, 634050 Tomsk, Russian Federation. E-mail:
kataask12@gmail.com

Kseniya I. Kazantceva - laboratory assistant, Laboratory of Supercritical Fluid Research and Application in Agrobiotechnology, The National Research Tomsk State University, 36, Lenin Avenue, 634050 Tomsk, Russian Federation. E-mail:
xenia.caz@yandex.ru

Marina A. Dragunova - PhD, researcher, laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya street 111a, Tomsk, Russian Federation. E-mail:
kirsay@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-7264-9904>

Sergei N. Krivolapov, interventional electrophysiologist, department of Surgical Arrhythmology and Cardiac Pacing, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya street 111a, Tomsk, Russian Federation. E-mail: cardiorhythm@mail.ru

Tatyana V. Moskovskich, junior researcher, laboratory of arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya street 111a, Tomsk, Russian Federation. E-mail:
moskovskih_tanya@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-8689-8493>

Sergey V. Popov, MD, professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Kievskaya street 111a, Tomsk, Russian Federation. E-mail: svp@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-1607-1482>.

Received 23.06.2025;
review received 08.08.2025;
accepted for publication 27.08.2025.

Ситкова Екатерина Сергеевна, канд. мед. наук, заведующий лабораторией высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: chekruzhova@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0988-3642>.

Баталов Роман Ефимович, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: romancer@rambler.ru; <http://orcid.org/0000-0003-1415-3932>.

Кургачев Дмитрий Андреевич, канд. хим. наук, старший научный сотрудник, заместитель заведующего лабораторией физико-химических методов анализа, НИ ТГУ, Томск, Россия, e-mail: Kurgachev.tsu@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2471-7287>.

Горн Екатерина Андреевна, инженер-исследователь, лаборатория исследования и применения сверхкритических флюидных технологий в агропищевых биотехнологиях (ЛИПСФТАБ), НИ ТГУ, Томск, Россия, e-mail: kataask12@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1322-3698>.

Ксения Игоревна Казанцева, лаборант, лаборатория исследования и применения сверхкритических флюидных технологий в агропищевых биотехнологиях (ЛИПСФТАБ), НИ ТГУ, Томск, Россия, e-mail: xenia.caz@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5306-6172>.

Марина Александровна Драгунова, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: kirsay@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-7264-9904>.

Сергей Николаевич Криволапов, врач по рентгенэндоваскулярным диагностике и лечению, отделение хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: cardiorhythm@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8121-8287>.

Татьяна Валерьевна Московских, канд. мед. наук, младший научный сотрудник лаборатории высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: moskovskih_tanya@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-8689-8493>.

Сергей Валентинович Попов, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия, e-mail: svp@cardio-tomsk.ru; <http://orcid.org/0000-0002-1607-1482>.

Received 23.06.2025;
review received 08.08.2025;
accepted for publication 27.08.2025.