



**Key words:** *instability, back conversion, plasma, mycophenolic acid, methyl dopa, desmethyl mebeverine acid*

**For citation:** Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Dzhurko Yu.A., Ryska M., Kubeš V., Shitov L.N. Approaches to the development of bioanalytical methods for determination of unstable substances in biological fluids, 3 (5), 106-115, DOI 10.29413/ABS.2018-3.5.16.

**ВВЕДЕНИЕ**

Одной из наиболее трудных задач биоаналитических исследований является количественное определение в биологических жидкостях веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы. Данной проблеме посвящён ряд статей, в которых приводятся примеры веществ и меры, предпринятые для предотвращения их деградации [6, 10, 16, 23, 24]. Однако в этих работах отсутствует описание процесса разработки методики и последовательности действий при выборе способа для замедления разложения веществ.

Основными причинами нестабильности молекул аналита или его метаболитов являются окисление и гидролиз. Наиболее распространёнными примерами легкоокисляющихся соединений являются лекарственные препараты, содержащие в своей структуре фенольные гидроксилы. Обратная конверсия глюкуронидов лекарственных веществ в исходные соединения является наиболее распространённым примером гидролиза соединений в биологических жидкостях [6, 10, 16, 23, 24]. Стабилизация веществ в биологических пробах достигается путём снижения температуры хранения, подбора антикоагулянта, добавления растворов стабилизаторов [6].

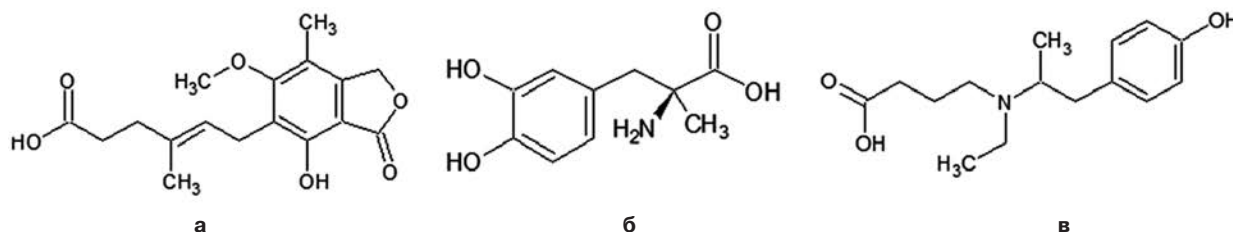
Выявление подходов к разработке методик определения нестабильных соединений в плазме

было выполнено на примере микофеноловой кислоты (МФК), содержащей в структуре один фенольный гидроксил и в процессе метаболизма образующей О-ацилглюкуронид (АГМФК) и фенольный глюкуронид (ФГМФК) [8, 9], деметилированной мебеверино- вой кислоты (ДМК), также содержащей в структуре один фенольный гидроксил и метаболизирующей с образованием фенольного глюкуронида (ФГДМК) [22], и метилдопы (МД), содержащей два фенольных гидроксила (рис. 1) [30, 32, 35, 36]. Данные методики разрабатывались для изучения биоэквивалентности (БЭ) лекарственных препаратов данных веществ.

**Цель исследования:** выявить подходы к разработке методик для определения в плазме веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы или образующих нестабильные метаболиты, для проведения биоаналитических исследований.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Определение МФК в плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) проводилось в диапазоне 0,5–30,0 мкг/мл (табл. 1). Для пробоподготовки был использован метод осаждения белков [5].



**Рис. 1.** Структурные формулы микофеноловой кислоты (а), метилдопы (б) и деметилированной мебевериновой кислоты (в).  
**Fig. 1.** Structure of mycophenolic acid (а), methyl dopa (б) and desmethyl mebeverine acid (в).

**Параметры ВЭЖХ-МС/МС-определения микофеноловой кислоты в плазме**

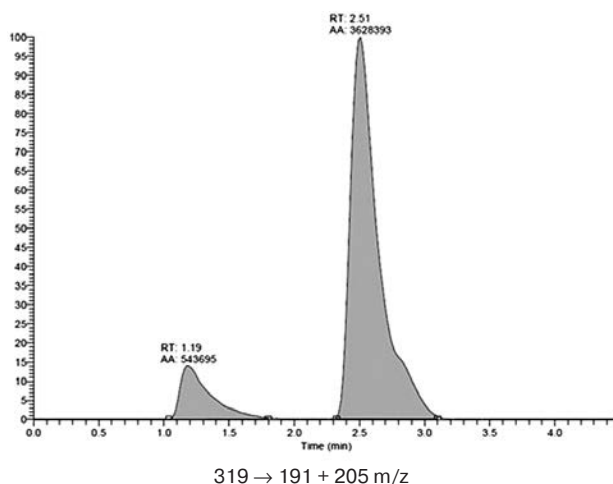
**Таблица 1**

**Parameters of HPLC-MS/MS determination of mycophenolic acid in plasma**

**Table 1**

| Подготовка проб            | Параметры хроматографического разделения   |                    | Параметры масс-спектрометрического детектирования                                       |   |
|----------------------------|--|--------------------|---|---|
|                            | Метод осаждения белков: к аликвоте плазмы 50 мкл плазмы добавляли 450 мкл метанольного раствора МФК-D3, полученную смесь перемешивали на вортексе, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин | Колонка            | Kinetex C18 (30*4,6 мм, 2,6 мкм) с предколонкой Phenomenex Security guard (C18, 4*3 мм) | Способ ионизации  |
| Состав подвижной фазы (ПФ) |  | Ацетонитрил : вода | Полярность  | Отрицательная   |
| Скорость потока            |  | 0,4 мл/мин         | Режим (MRM)   | Для МФК: 319 → 191 + 205 m/z.<br>Для МФК-D <sub>3</sub> : 322 → 191 + 205 m/z |
| Режим элюирования          |  | Градиентный        |   | Время анализа   |

На начальном этапе разработки данной методики была изучена обратная конверсия фенольного глюкуронида МФК в источнике ионов (рис. 2): выбранные параметры хроматографического процесса позволили разделить анализируемое вещество и ФГМФК.



**Рис. 2.** Хроматограмма смеси МФК ( $t_R = 2,51$  мин) и ФГМФК ( $t_R = 1,19$  мин), полученная при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС.

**Fig. 2.** Chromatogram of the mixture of mycophenolic acid ( $t_R = 2.51$  min) and MPAG ( $t_R = 1.19$  min) obtained using HPLC-MS/MS.

ВЭЖХ-МС/МС-методика определения МФК применялась при проведении исследования биоэквивалентности препаратов микофенолата натрия (МФН) в форме таблеток, покрытых оболочкой. Величина максимальной концентрации МФК в плазме ( $C_{max}$ ) после приёма препарата сравнения составила  $12,29 \pm 5,53$  мкг/мл [5]. Таким образом, выбранное значение нижнего предела количественного определения методики (НПКО) находится ниже, чем 5 % от  $C_{max}$  и его величины достаточно для изучения биоэквивалентности таблетированных форм МФН. Аналогичное значение НПКО применялось для проведения исследований БЭ [31, 38] и терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) [11] препаратов МФК. Однако данный уровень чувствительности методики не позволил рассчитать такие фармакокинетические параметры, как константа элиминации, площадь под

фармакокинетической кривой от нулевого значения времени до бесконечности, период полувыведения, среднее время удержания в крови [4].

При определении микофеноловой кислоты с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) НПКО был снижен до 0,05 мкг/мл, как в большинстве методик определения данного аналита в биологических жидкостях [7, 8, 20, 21]. Это обеспечит возможность детектирования следовых количеств МФК в плазме. Аналитический диапазон составил 0,05–30,00 мкг/мл. Для пробоподготовки была также использована депротенинизация (табл. 2).

При данных параметрах хроматографического процесса было также подтверждено отсутствие влияния фрагментации ФГМФК на точность количественного определения аналита (рис. 3).

Время одного анализа при использовании данной методики составляет 5 мин., что значительно быстрее, чем в методиках [8, 28, 29, 33]. Применение осаждения белков даёт возможность увеличить производительность процесса пробоподготовки в сравнении с [7, 8, 21, 26, 28].

Количественное определение деметилированной мебевериновой кислоты совместно с минорным метаболитом мебеверина – мебевериновой кислотой (МК) – в плазме крови проводили методом ВЭЖХ-МС/МС в диапазоне 10–2000 нг/мл для обоих аналитов (табл. 3) [18].

При разработке данной методики исследовалась обратная конверсия фенольного глюкуронида ДМК в процессе ионизации. При этом фрагментация данного соединения в источнике ионов полностью отсутствовала (рис. 4).

Данная методика была использована для изучения фармакокинетики препарата «Дюспаталин» в форме капсул с пролонгированным высвобождением [18]. Преимуществами этой методики, в сравнении с работами С.А. Khatri et al. [17] и R. Maddela et al. [26], являются более экспрессный способ подготовки проб (осаждение белков без последующего концентрирования) и более короткое время анализа (на 0,5 мин меньше, чем по данным R. Maddela et al. [26]; на 2,5 мин меньше, чем по данным С.А. Khatri et al. [17]). Значение НПКО МК и ДМК, установленное на уровне 10 нг/мл,

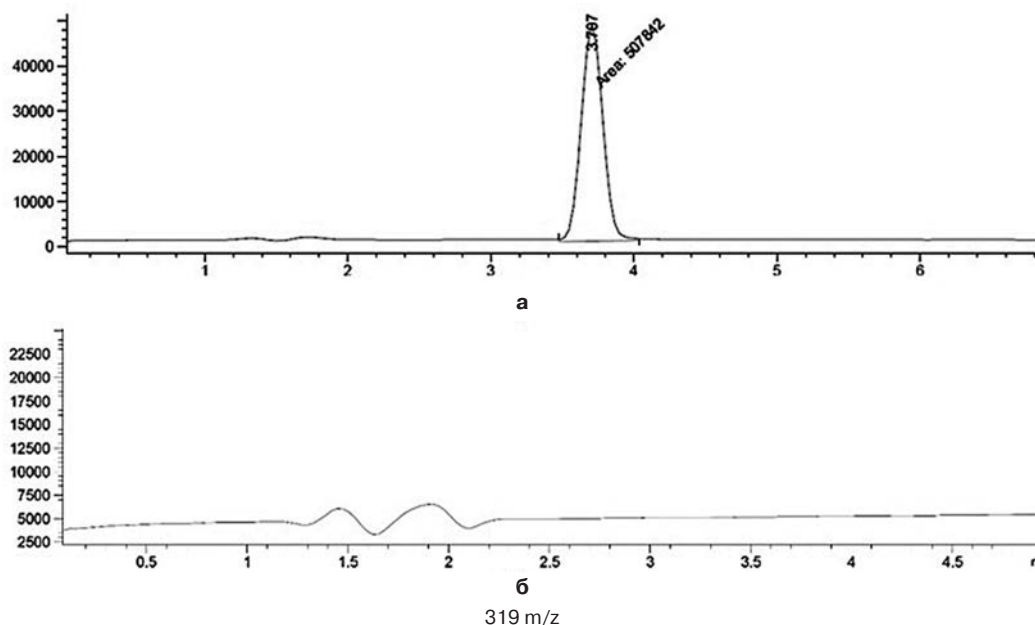
**Таблица 2**

**Параметры ВЭЖХ-МС-определения микофеноловой кислоты в плазме**

**Table 2**

**Parameters of HPLC-MS determination of mycophenolic acid in plasma**

| Подготовка проб            | Параметры хроматографического разделения  |  | Параметры масс-спектрометрического детектирования |                  |
|----------------------------|---|--|---|------------------|
|                            | Метод осаждения белков: к 50 мкл плазмы добавляли 200 мкл метанола, перемешивали на вортексе, затем центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об./мин | Колонка  | Zorbax Eclipse Plus C18 (100*4,6 мм, 3,5 мкм)     | Способ ионизации |
| Состав подвижной фазы (ПФ) |   | Ацетонитрил : вода : 0,1%-й раствор муравьиной кислоты | Полярность  | Отрицательная    |
| Скорость потока            |   | 0,6 мл/мин   | Режим (SIM)                                       | Для МФК: 319 m/z |
| Режим элюирования          |   | Изократический   | Время анализа                                     | 5,0 мин          |

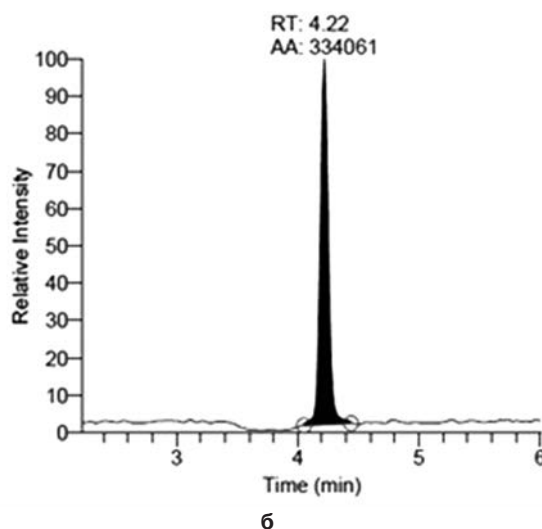
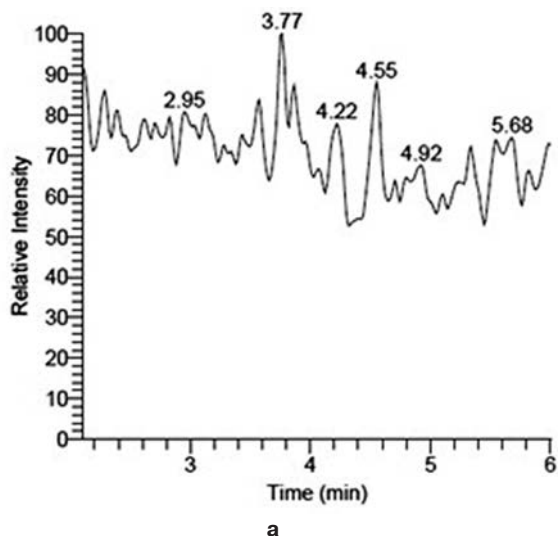


**Рис. 3.** Хроматограммы растворов микофеноловой кислоты (а) и фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты (б), полученные при использовании метода ВЭЖХ-МС.  
**Fig. 3.** Chromatograms of solutions of mycophenolic acid (a) and phenolic glucuronide of mycophenolic acid (b) obtained using HPLC-MS method.

**Таблица 3**  
**Table 3**

**Параметры ВЭЖХ-МС/МС-определения мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме**  
**Parameters of HPLC-MS/MS determination of mebeverine acid and desmethyl mebeverine acid in plasma**

| Подготовка проб            | Параметры хроматографического разделения  |  | Параметры масс-спектрометрического детектирования |   |
|----------------------------|---|--|---|---|
|                            | Метод осаждения белков:<br>400 мкл метанольного раствора МК-D <sub>5</sub> и ДМК-D <sub>5</sub> смешивали с аликвотой плазмы 100 мкл на вортексе и центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об./мин | Колонка № 1  | Luna C8 Mercury (20*4,0 мм, 5 мкм)                | Способ ионизации  |
| Колонка № 2                |   | Luna 5u C8 (150*4,6 мм, 5 мкм)                       |   |   |
| Состав подвижной фазы (ПФ) |   | Ацетонитрил : метанол : и формиат аммония 80 ммоль/л | Полярность  | Положительная   |
| Режим хром. разделения     |   | Двумерная хроматография                              | Режим (MRM)                                       | Для МК: 280 → 121 m/z; для ДМК: 266 → 107 m/z; для МК-D <sub>5</sub> : 285 → 121 m/z; для ДМК-D <sub>5</sub> : 271 → 107 m/z. |
| Режим элюирования          |   | Градиентный  |   |   |
|                            |   | Время анализа  | 6,0 мин   |   |



266 → 107 m/z

**Рис. 4.** Хроматограммы растворов фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты (а) и деметилированной мебевериновой кислоты (б).  
**Fig. 4.** Chromatograms of solutions of desmethyl mebeverine acid phenolic glucuronide (a) and desmethyl mebeverine acid (b).

было в 10 раз ниже, чем в исследовании С.А. Khatri et al. [17]. В методиках S. Elliott, V. Burgess [12] и 34. A. Stockis [34] для подготовки проб применяется длительная процедура жидкостно-жидкостной экстракции и используются менее селективные методы анализа – ВЭЖХ со спектрофотометрическим и кулонометрическим детектированием. Также в данных методиках отсутствует возможность определения ДМК, которая является основным метаболитом мебеверина.

ВЭЖХ-МС/МС-определение метилдопы в образцах плазмы осуществлялось в диапазоне 0,02–3,00 мкг/мл. Хроматографическое разделение осуществлялось с помощью двух колонок Luna Phenyl-Hexyl (50\*3,0 мм; 5 мкм) и Synergi Fusion-RP 80Å (150\*3,0 мм; 4 мкм) в режиме двумерной хроматографии (табл. 4) [4].

Разработанная методика количественного определения метилдопы в плазме была применена использована при исследовании биоэквивалентности её таблеток [19]. Использование метода осаждения белка позволило существенно ускорить процесс подготовки проб, по сравнению с методами жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракцией, использованными в опубликованных ранее методиках [29, 35].

Валидация разработанных методик проведена согласно требованиям руководства Европейского медицинского агентства (ЕМА) [13], Руководства по экспертизе лекарственных средств Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП) (Т. 1) [2] и Решения Совета Евразийской экономической комиссии № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС)» [1]. Полученные результаты валидационных тестов по показателям селективность, линейность, внутрисерийная и межсерийная прецизионность и правильность, эффект разведения, эффект матрицы, эффект переноса из предыдущей пробы, стабильность отвечали всем установленным критериям приемлемости [3, 4, 18, 19].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В ходе анализа данных литературы необходимо обращать внимание на присутствие в структуре из-

учаемого соединения потенциально нестабильных функциональных групп, а также на наличие у него метаболитов, способных в процессе хранения, подготовки проб, а также хромато-масс-спектрометрического определения переходить в исходное вещество. Проведённый обзор показал, что растворы антиоксидантов не использовались при проведении биоаналитических исследуемых соединений [8, 9, 12, 17, 22, 27, 30, 32, 34, 35, 36]. Однако в случае метилдопы, содержащей в структуре два фенольных гидроксила, существует потенциальный риск её окисления. Так, при определении в плазме аналогичных по структуре веществ, леводопы [24] и допамина [37], применяли, соответственно, глутатион и 10%-й раствор натрия метабисульфита. В ряде работ, посвящённых определению микофеноловой кислоты в биологических жидкостях, отмечена необходимость использования буферных растворов для предотвращения гидролиза АГМФК и ФГМФК [8, 9]. Публикации, посвящённые исследованиям фармакокинетики метаболитов мебеверина, немногочисленны, и изучение обратной конверсии ФГДМК в данных работах не было выполнено [12, 17, 22, 27, 34].

На начальном этапе разработки методик осуществлялся подбор антикоагулянта. Так, используемый антикоагулянт не повлиял на стабильность МФК в плазме крови. Результаты предварительной оценки стабильности аналита показали, что после 24 ч хранения образцов при комнатной температуре и 3 циклов замораживания/размораживания среднее содержание микофеноловой кислоты при использовании К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития находилось в диапазоне 85,0–115,0 % от начальной концентрации. Исследование обратной конверсии ФГМФК в процессе хранения образцов проводилось на образцах с концентрацией данного метаболита 100 мкг/мл [8, 9, 11, 15, 20, 26, 31]. При применении НПКО ВЭЖХ-МС/МС-методики 0,5 мкг/мл после 24 ч хранения при комнатной температуре степень гидролиза данного метаболита не превышала максимально допустимого уровня (20 % от площади хроматографического пика образца МФК с концентрацией на уровне НПКО) при использовании КЗЭДТА и гепарината лития – 2,58 %

**Таблица 4**  
Параметры ВЭЖХ-МС/МС-определения метилдопы в плазме

**Table 4**  
Parameters of HPLC-MS/MS-determination of methyl dopa in plasma

| Подготовка проб            | Параметры хроматографического разделения  |   | Параметры масс-спектрометрического детектирования |  |
|----------------------------|---|---|---|--|
|                            | Метод осаждения белков: 400 мкл метанольного раствора МД-D <sub>3</sub> добавляли к 100 мкл плазмы, затем перемешивали на вортексе, центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об./мин. и температуре +4 °С | Колонка №1                                  | Luna Phenyl-Hexyl (50*3,0 мм, 5 мкм)              | Способ ионизации   |
| Колонка №2                 |   | Synergi Fusion – RP 80Å (150*3,0 мм, 4 мкм) |   |  |
| Состав подвижной фазы (ПФ) |   | Метанол : вода : формиат аммония 80 ммоль/л | Полярность  | Положительная  |
| Режим хром. разделения     |   | Двумерная хроматография                     | Режим (MRM)                                       | Для МД: 212 → 139 m/z;<br>Для МД-D <sub>3</sub> : 215 → 169 m/z. |
| Режим элюирования          |   | Изократический                              |   |  |

и 7,44 % от площади хроматографического пика образца НПКО соответственно.

При выборе более низкого значения нижнего предела количественного определения методики 0,05 мкг/мл обратная конверсия ФГМФК превышала максимально допустимый уровень после 6 ч хранения при комнатной температуре при использовании К<sub>3</sub>ЭДТА (рис. 5). В случае применения гепарината лития степень гидролиза метаболита выходил за установленные пределы уже спустя 2 ч. Поэтому для дальнейших исследований был использован К<sub>3</sub>ЭДТА.

Отсутствие влияния обратной конверсии АГМФК и ФГМФК на правильность определения микофеноловой кислоты было также доказано путём повторного анализа образцов плазмы, полученных от 10 белых беспородных крыс-самцов массой 250 ± 10 г. Субстанция микофенолата натрия вводилась крысам перорально в виде водного раствора в дозировке 33,0 мг/кг. Отбор образцов крови был произведён через 2 ч после введения: данная точка соответствует времени достижения максимальной концентрации обоих метаболитов [25]. Различие между начальными значениями и результатами измерений, полученными спустя 1 мес. после отбора, находилось в диапазоне от -3,43 % до 9,49 %, что не превышает максимально допустимого значения 20 % [1, 2, 13]. Таким образом, при проведении биоаналитических исследований микофеноловой кислоты в качестве антикоагулянта следует применять К<sub>3</sub>ЭДТА. При этом использование каких-либо растворов стабилизаторов не требуется.

Результаты предварительных испытаний краткосрочной стабильности деметилированной мебевериновой кислоты в образцах плазмы, содержащей К<sub>3</sub>ЭДТА и гепаринат лития, после 24 ч хранения при комнатной температуре и стабильности после 3 циклов замораживания/размораживания соответствовали установленным требованиям. Гидролиз фенольного глюкуронида ДМК в образцах с концен-

трацией 2000 нг/мл при комнатной температуре также не наблюдался. Следовательно, добавления плазме раствора стабилизатора в данном случае не требуется. Для дальнейших испытаний был выбран К<sub>3</sub>ЭДТА, т. к. данный антикоагулянт наиболее часто используется в нашей лаборатории.

Результаты предварительного изучения стабильности метилдопы не отвечали критериям приемлемости при использовании обоих антикоагулянтов (К<sub>3</sub>ЭДТА и гепарината лития). Поэтому на следующем этапе разработки методики осуществлялся подбор комбинации антикоагулянта и раствора антиоксиданта. После проведённых испытаний (рис. 6) было установлено, что оптимальным для предотвращения окисления аналита является добавление к К<sub>3</sub>ЭДТА-плазме смеси антиоксидантов, включающей аскорбиновую кислоту, натрия сульфит, натрия гидрокарбонат в концентрациях 5 %, 0,2 % и 2,4 % соответственно в объёмном соотношении 1:5 (раствор антиоксиданта : плазма). Данная комбинация позволила не только предотвратить разложение МД, но и повысить уровень аналитического сигнала.

В работах С.Н. Oliveira et al. [29], Н. Valizadeh et al. [35], L. Vlase et al. [36] раствор антиоксиданта не был использован. Это могло послужить причиной значительного расхождения полученных значений фармакокинетических параметров метилдопы, полученных в ходе данных исследований. Время одного анализа в данных методиках составило 3,4 мин [29], 3,0 мин [35] и 1,05 мин [36]. Однако при этом не были использованы растворы стабилизаторов, которые необходимы для предотвращения окисления метилдопы. Добавление раствора стабилизатора к плазме требует изменения программы хроматографического разделения для устранения усиливающихся при этом матричных эффектов [3]. Поэтому время хромато-масс-спектрометрического определения в разработанной методике составило 8 мин.

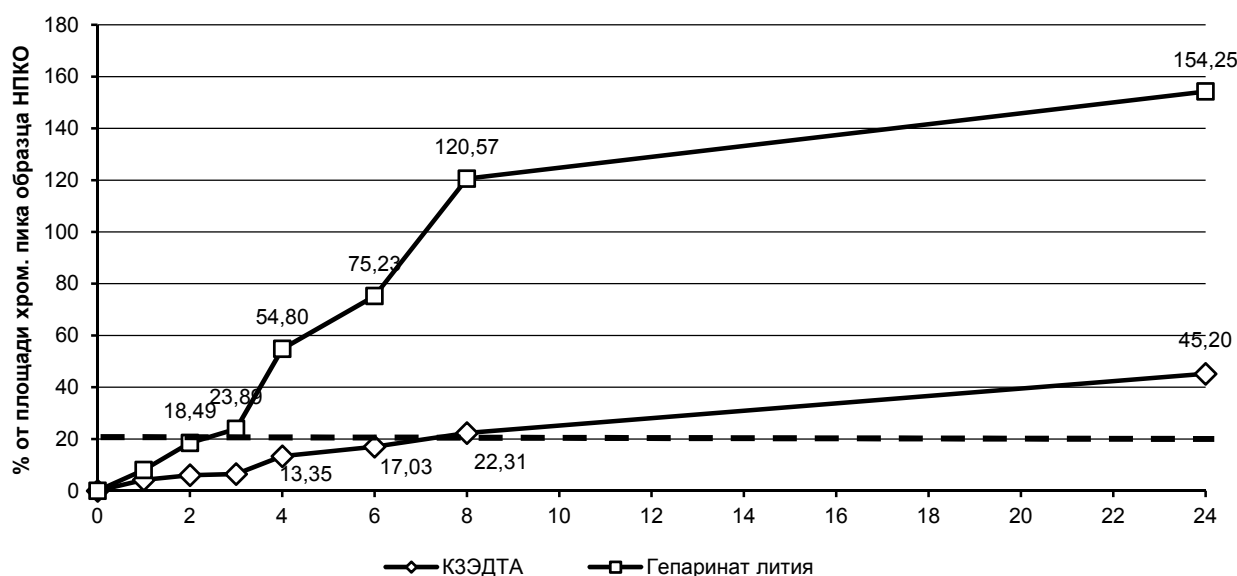


Рис. 5. Изучение обратной конверсии фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты в процессе хранения.

Fig. 5. Reverse conversion of phenolic glucuronides of mycophenolic acid during storage.

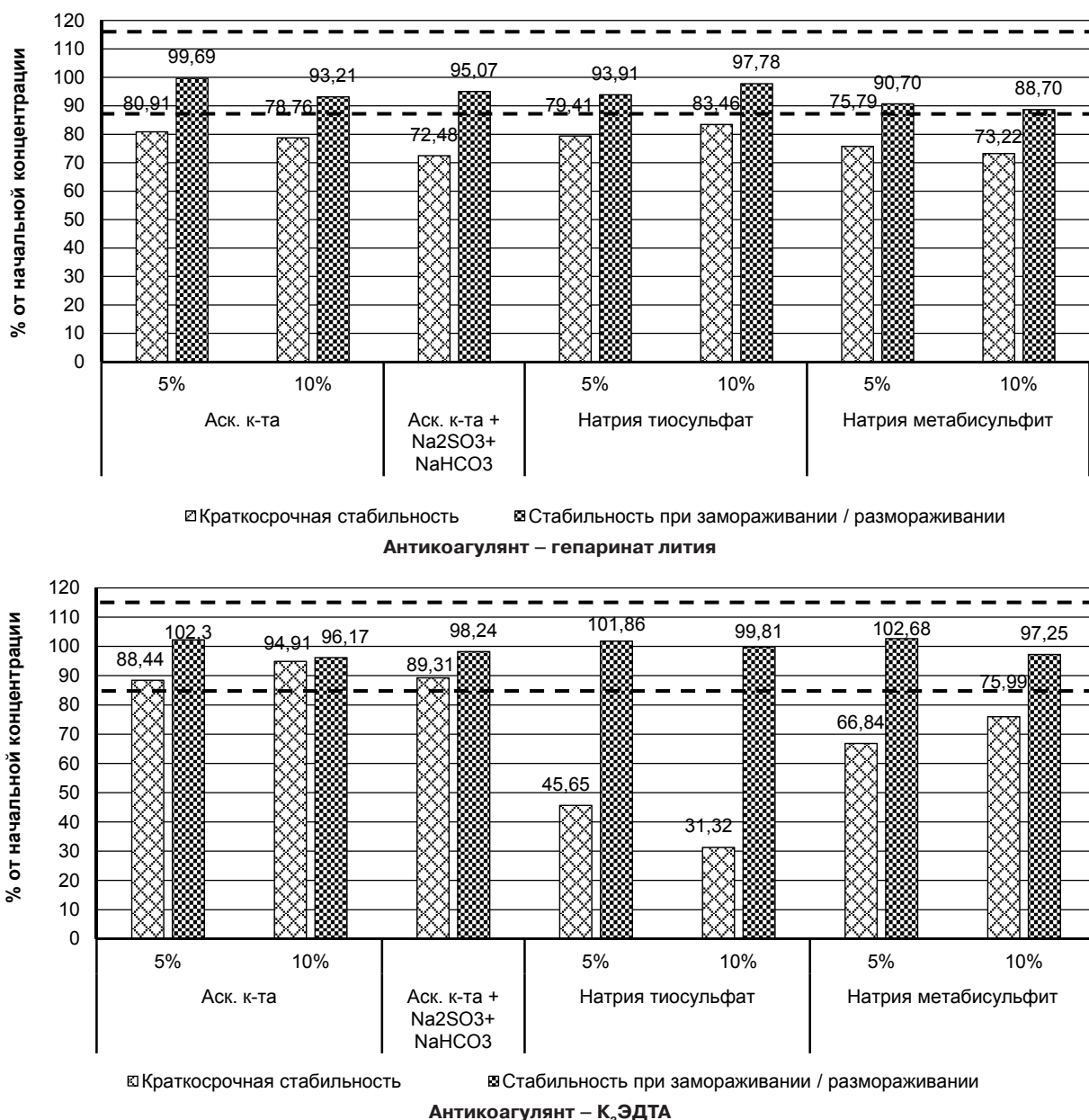


Рис. 6. Подбор комбинации антикоагулянта и антиоксиданта для стабилизации метилдопы в плазме.

Fig. 6. Choosing the combination of anticoagulant and antioxidant for stabilization of methyl dopa in plasma.

Таким образом, предложенные подходы к разработке биоаналитических методик для определения в плазме веществ, содержащих нестабильные функциональные группы или образующих нестабильные метаболиты, пригодны для исследований всех групп легкоразлагающихся соединений (рис. 7).

Этап разработки и валидации биоаналитической методики быть проведён до начала клинической части исследования фармакокинетики и БЭ: до отбора образцов у добровольцев должны быть известны результаты испытаний стабильности аналита и меры, необходимые для предотвращения разложения изучаемого вещества или его метаболитов. При этом сотрудниками лаборатории составляются подробные инструкции для персонала клинического центра по приготовлению растворов стабилизаторов, применяемым антикоагулянтам,

специальным условиям температурного режима и освещения (при работе с чувствительными к свету веществами) [22].

После исследования образцов, полученных от добровольцев, необходимо провести ISR-тест, чтобы гарантировать стабильность изучаемых веществ и отсутствие обратной конверсии метаболитов в реальных объектах. Руководство ЕАЭС по проведению исследований БЭ [1], а также Руководство по экспертизе лекарственных средств (Том 1) [2] рекомендуют при количестве отобранных проб меньше 1000 подвергать реанализу 10 % проб, а при количестве больше 1000 – 5 % проб. Руководство ЕМА [13] рекомендует анализировать дополнительно 5 % образцов от количества, превышающего 1000, руководство FDA [14] – 7 % образцов независимо от объёма исследования.





4. Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Kubes V., Шитов Л.Н., Яичков И.И., Шитова А.М. Методика количественного определения метилдопы в плазме крови человека // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 63, № 3. – С. 105–108.

Khokhlov AL, Dzhurko YA, Kubeš V. Shitov LN, Yaichkov II, Shitova AM. (2017). Method for quantitative determination of methyl dopa in human plasma [Metodika kolichestvennogo opredeleniya metildopy v plazme krovi cheloveka]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 63 (3), 105-108.

5. Хохлов А.Л., Яичков И.И., Шитова А.М., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А. Исследование сравнительной фармакокинетики таблетированных форм микофеноловой кислоты // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – № 4. – С. 3–8.

Khokhlov AL, Yaichkov II, Shitova AM, Shitov LN, Dzhurko YA, Miroshnikov AE. (2017). Study of comparative pharmacokinetics of coated tablets of mycophenolic acid [Issledovanie sravnitel'noy farmakokinetiki tabletirovannykh form mikofenolovoy kisloty]. *Farmakokinetika i farmakodinamika*, (4), 3-8.

6. Яичков И.И., Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н., Трубников А.А. Способы стабилизации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях при биоаналитических исследованиях (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 2. – С. 160–164.

Yaichkov II, Khokhlov AL, Dzhurko YA, Shitov LN, Trubnikov AA (2017). Methods of stabilizing drug substances and their metabolites in biological fluids in bioanalytical researches (review) [Sposoby stabilizatsii lekarstvennykh veshchestv i ikh metabolitov v biologicheskikh zhidkostyakh pri bioanaliticheskikh issledovaniyakh (obzor)]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, (2), 160-164.

7. Almeida S, Filipe A, Neves R, Spínola AC, Tanguay M, Ortuño J, Farré A, Torns A. (2010). Mycophenolate mofetil 500-mg tablet under fasting conditions: single-dose, randomized-sequence, open-label, four-way replicate crossover, bioequivalence study in healthy subjects. *Clin Therap*, 32 (3), 556-574. DOI: 10.1016/j.clinthera.2010.03.008

8. Benoit-Biancamano MO, Caron P, Levesque E, Delage R, Couture F, Guillemette C. (2007). Sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 858, 159-167. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.08.023

9. Brandhorst G, Streit F, Goetze S, Oellerich M, Armstrong VW. (2006). Quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry of mycophenolic acid and its phenol and acyl glucuronide metabolites. *Clin Chem*, 52 (10), 1962-1964. DOI: 10.1373/clinchem.2006.074336

10. Dell D. (2004). Labile metabolites. *Chromatogr Suppl*, 59, 139-148. DOI: 10.1365/s10337-003-0169-5

11. Elbarty FA, Shoker AS. (2007). Liquid chromatographic determination of mycophenolic acid and its metabolites in human kidney transplant plasma: Pharma-

cokinetic application. *J Chromatogr B*, 859 (2), 276-281. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.09.036

12. Elliott S, Burgess V. (2006). Investigative implications of the instability and metabolism of mebeverine. *J Anal Toxicol*, 30 (2), 91-97.

13. European Medicines Agency. Committee for Medical Products of Human Use. (2010). Guideline on bioanalytical method validation. – Available at: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).

14. Food and Drug administration. (2013). Guidance for industry. Bioanalytical method validation. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107>.

15. Heinig K, Bucheli F, Hartenbach R, Gajate-Perez A. (2010). Determination of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide in human plasma, ultrafiltrate, blood, DBS and dried plasma spots. *Bioanal*, 2 (8), 1423-1435. DOI: 10.4155/bio.10.99

16. Hilhorst M, Van Amsterdam P, Heinig K, Swanziger E, Abbott R. (2015). Stabilization of clinical samples collected for quantitative bioanalysis – a reflection from the European Bioanalysis Forum. *Bioanal*, 7 (3), 333-343. DOI: 10.4155/bio.14.290

17. Khatri CA, Phanikumar ChV, Jayaveera K. (2012). Development and validation of bioanalytical method for simultaneous quantification of veratric acid, mebeverine acid and desmethyl mebeverine acid in human EDTA plasma by using LC-MS/MS. *Pharm Chem J*, 4 (6), 11-18.

18. Khokhlov AL, Dzhurko YA, Yaichkov II, Shitov LN, Shitova AM, Miroshnikov AE, Khozova LA. (2017). The rapid and sensitive HPLC-MS/MS-Method of determination of mebeverine metabolites in human plasma. *Mathews J Pharm Sci*, 1 (2), 010. Available at: [mathewsopenaccess.com/PDF/pharmaceutical-science/M\\_J\\_Pharm\\_2\\_1\\_010.pdf](http://mathewsopenaccess.com/PDF/pharmaceutical-science/M_J_Pharm_2_1_010.pdf).

19. Khokhlov AL, Yaichkov II, Dzhurko YA, Shitov LN. (2017). Methodical approaches to bioassay of phenolic hydroxylenes contain substances. *Med News North Cauc*, 12 (3), 294-299. DOI: 10.14300/MNNC.2017.12088

20. Kuhn J, Götting C, Kleesiek K. (2009). Sample cleanup-free determination of mycophenolic acid and its glucuronide in serum and plasma using the novel technology of ultra-performance liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, 80 (5), 1894-1898. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.10.040

21. Kuhn J, Prante C, Kleesiek K, Götting C. (2009). Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry assay. *Clin Biochem*, 42 (1-2), 83-90. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.10.004

22. Kristinsson J, Snorrabttir I, Johannsson M. (1994). The metabolism of mebeverine in man: identification of urinary metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. *Pharmacol Toxicol*, 74 (3), 174-180.

23. Li W, Zhang J, Tse F. (2013). Handbook of LC-MS bioanalysis. New Jersey, 675 p.

24. Li W, Zhang J, Tse F. (2011). Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. *Biomed Chromatogr*, 25 (1-2), 258-277. DOI: 10.1002/bmc.1572

25. Liu Q, Jiao Z, Zhong M, Zhang M, Geng F, Zhao H. (2017). Effect of long-term co-administration of com-

pound glycyrrhizin tablets on the pharmacokinetics of mycophenolic acid in rats. *Xenobiotica*, 46 (7), 627-633. DOI: 10.3109/00498254.2015.1103386

26. Maddela R, Pilli NR, Maddela S. (2017). A novel and rapid LC-MS/MS assay for the determination of mycophenolate and mycophenolic acid in human plasma. *J Young Pharm*, 9 (1), 107-114. DOI: 10.5530/jyp.2017.9.20

27. Moskaleva NE, Baranov PA, Mesonzhnik NV, Appolonova SA. (2017). HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of desmethylmebeverine acid, mebeverine acid and mebeverine alcohol in human plasma along with its application to a pharmacokinetics study. *J Pharm Biomed Anal*, 138, 118-125. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.02.006

28. Ohyama K, Kinoshita N, Kishikawa N, Kuroda N. (2008). A simple and rapid CZE method for the analysis of mycophenolic acid and its phenol glucuronide metabolite in human. *Electrophoresis*, 29 (17), 3658-3664. DOI: 10.1002/elps.200700952

29. Ohyama K, Kishikawa N, Nakagawa H, Kuroda N, Nishikido M, Teshima M, To H, Kitahara T, Sasaki H. (2008). Simultaneous determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human serum by capillary zone electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 47 (1), 201-206. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.12.028

30. Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE, Sucupira M, Graudens GS, Muscará MN, Nuccia G. (2002). Quantification of methyl dopa in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B*, 768 (2), 341-348. DOI: 10.1016/S1570-0232(01)00612-2

31. Rissling O, Bauer S, Shipkova M, Glander P, Mai M, Hambach P, Budde K. (2016). Simultaneous determination of mycophenolate and its metabolite

mycophenolate-7-o-glucuronide with an isocratic HPLC-UV-based method in human plasma and stability evaluation. *Scand J Clin Lab Invest*, 76 (8), 612-619. DOI: 10.1080/00365513.2016.1230775

32. Róna K, Ary K, Renczes G, Gachályi B, Grézal GY, Drabant S, Klebovich I. (2001). Comparative bioavailability of alpha-methyl dopa normal and film tablet formulations after single oral administration in healthy volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacok*, 26 (1-2), 25-30.

33. Shihabi ZK. (2009). Enhanced detection in capillary electrophoresis: Example determination of serum mycophenolic acid. *Electrophoresis*, 30 (9), 1516-1521.

34. Stockis A, Guelen PJM, De Vos D. (2002). Identification of mebeverine acid as the main circulating metabolite of mebeverine in man. *J Pharm Biomed Anal*, 29 (1-2), 335-340.

35. Valizadeh H, Nemati M, Hallaj-Nezhadi S, Ansarin M, Zakeri-Milani P. (2010). Single dose bioequivalence study of a-methyl dopa tablet formulations using a modified HPLC method. *Arzneimittelforschung*, 60 (10), 607-611. DOI: 10.1055/s-0031-1296333

36. Vlase L, Miha D, Popa D-S, Popa A, Briciu C, Loghin F, Ciortea R, Miha C. (2013). Determination of methyl dopa in human plasma by LC/MS-MS for therapeutic drug monitoring. *Stud Univ Babeş-Bolyai Chem*, 58 (1), 31-41.

37. Van de Merbel NC, Hendriks G, Imbos R, Tuunainen J, Rouru J, Nikkanen H. (2011). Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC-MS/MS: the importance of sample preparation. *Bioanal*, 3 (17), 1949-1961. DOI: 10.4155/bio.11.170

38. Wang L, Qiang W, Li Y, Cheng Z, Xie M. (2017). A novel freeze-dried storage and preparation method for the determination of mycophenolic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 31 (9), 3-27. DOI: 10.1002/bmc.3958

#### Сведения об авторах Information about the authors

**Хохлов Александр Леонидович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5; e-mail: al460935@yandex.ru)

**Khokhlov Alexandr Leonidovich** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Clinical Pharmacology, Yaroslavl State Medical University (150000, Yaroslavl, ul. Revolyutsionnaya, 5; e-mail: al460935@yandex.ru)

**Яичков Илья Игоревич** – аспирант кафедры клинической фармакологии, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского» (e-mail: ilya\_1993\_08@mail.ru)

**Yaichkov Ilya Igorevich** – Postgraduate at the Department of Clinical Pharmacology, Yaroslavl State Medical University; Junior Research Officer at the M.V. Dorogov Centre of Transfer of Pharmaceutical Technologies, K.D. Ushinsky Yaroslavl State Pedagogical University (150000, Yaroslavl, ul. Respublikanskaya, 108/1; e-mail: ilya\_1993\_08@mail.ru)

**Джурко Юрий Александрович** – кандидат фармацевтических наук, старший аналитик, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль» (150045, г. Ярославль, Ленинградский пр., 52г; тел. 8 (4852) 98-87-34; e-mail: y.dzhurko@qayar.ru)

**Dzhurko Yuriy Alexandrovich** – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior Analyst, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC (150045, Yaroslavl, Lenyngradsky pr., 52g, tel. (4852) 98-87-34; e-mail: y.dzhurko@qayar.ru)

**Рыска Мирослав** – доктор естественных наук, RNDr, экс-президент, Quinta-Analytica s.r.o. (Pražská 1486/18c, 102 00 Praha 15, Czechia; e-mail: miroslav.ryska@quinta.cz)

**Miroslav Ryska** – Doctor of Natural Sciences, RNDr, ex-president, Quinta-Analytica s.r.o. (Pražská 1486/18c, 102 00 Praha 15, Czechia; e-mail: miroslav.ryska@quinta.cz)

**Владимир Кубеш** – заведующий лабораторией, Quinta-Analytica s.r.o. (e-mail: vladimir.kubes@quinta.cz)

**Vladimir Kubeš** – Head of the Laboratory, Quinta-Analytica s.r.o. (e-mail: vladimir.kubes@quinta.cz)

**Шитов Леонид Николаевич** – кандидат биологических наук, заведующий биоаналитической лабораторией, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль»; ассистент кафедры поликлинической терапии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: schitov@inbox.ru)

**Shitov Leonid Nikolaevich** – Candidate of Biological Sciences, Head of the Bioanalytical Laboratory, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, Teaching Assistant at the Department of Ambulatory Treatment and Clinical Laboratory Diagnostics, Yaroslavl State Medical University (e-mail: schitov@inbox.ru)