

Определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Бочков П. О., Хрустова И. П., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Шевченко Р. В., Жердев В. П.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. ГИЖ-290 – новое производное 4-фенилпирролидона, синтезированное на основе рацетамов, сочетающих противосудорожное и ноотропное действие. ГИЖ-290 обладает широким спектром противосудорожных и ноотропных эффектов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием разработана и валидирована методика количественного определения нового потенциального противосудорожного средства соединения ГИЖ-290 в плазме крови крыс. Для извлечения аналита использовали жидкость-жидкостную экстракцию диэтиловым эфиром. Валидацию методики проводили определением таких её параметров, как селективность, линейность, правильность, прецизионность и стабильность. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции равным 0,999. Процент извлечения ГИЖ-290 из плазмы крови в среднем составил 79,2 %. Правильность в течение рабочего цикла и между циклами была $\leq 19,32$ %, прецизионность $\leq 12,14$ %. Установлено, что образцы плазмы крови, содержащие ГИЖ-290, можно хранить при комнатной температуре в течение рабочего дня.

Ключевые слова: противосудорожное действие; ГИЖ-290; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; плазма крови

Для цитирования:

Бочков П. О., Хрустова И. П., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Шевченко Р. В., Жердев В. П. Определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(2):3–10. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-3-10>

Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Determination of a novel anticonvulsant drug GIZh-290 in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Bochkov PO, Khrustova IP, Litvin AA, Kolyvanov GB, Shevchenko RV, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. GIZh-290 is a new derivative of 4-phenylpyrrolidone, based on the structures of racetams that combine anticonvulsant and nootropic effects. The method of high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection was developed and validated for the quantitative determination of a new potential anticonvulsant compound GIZh-290 in rat blood plasma. For the extraction of the analyte, liquid-liquid extraction with diethyl ether was used. The method was validated based on its selectivity, linearity, accuracy, precision, and stability. The linearity of the method was confirmed by a high correlation coefficient of 0.999. The percent recovery of GIZh-290 from blood plasma was 79.2 %. The intra- and inter-batch accuracy were 19.32 and 12.14 %. It was found that blood plasma samples containing GIZh-290 can be stored at ambient temperature during the working day.

Keywords: anticonvulsant effect; GIZh-290; Method validation; Pharmacokinetics; LC–MS/MS; Rat plasma

For citations:

Bochkov PO, Khrustova IP, Litvin AA, Kolyvanov GB, Shevchenko RV, Zherdev VP. Determination of a novel anticonvulsant drug GIZh-290 in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(2):3–10. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-3-10>

Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

ГИЖ-290 – новое производное 4-фенилпирролидона, синтезированное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», на основе структур рацетамов, сочетающих противосудорожное и ноотропное действие. ГИЖ-290 обладает широким спектром противосудорожных эффектов: устраняет генерализованные судороги в тесте антагонизма с максимальным электрошоком и судороги, вызванные пилокарпином, увеличивая латентный период наступления судорог и процент выживших животных [1, 2], а также устраняет электроэнцефалограмму проявления судорожной активности в тесте бемегридовых судорог и в модели хронической фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии [2].

Исследование ноотропного эффекта показало, что по влиянию на процессы обучения и воспроизведения ГИЖ-290 в эквивалентных дозах превосходит пиррацетам в 160 раз [1, 3].

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) предоставляет уникальные возможности в доклинических, биофармацевтических и клинических исследованиях [4–6]. Этот метод применим к разнообразным фармакологическим средствам, относящимся к различным химическим классам, и позволяет определять их в биологических средах с высокой селективностью, чувствительностью, скоростью анализа [7]. Режим множественных молекулярных реакций (MRM) обеспечивает детектирование определённого дочернего иона, заранее выбранного оператором. Дочерний ион

получают в результате фрагментации предварительно ионизированной исходной/родительской молекулы. В качестве источника ионизации, как правило, используется электроспрей. Для каждого соединения совокупность родительского и дочернего иона является уникальной, что обуславливает высокую селективность методики количественного определения с использованием масс-спектрометрического детектора [8].

Цель исследования – разработка ВЭЖХ-МС методики определения ГИЖ-290 в плазме крови крыс после простой жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ).

Методику валидировали по следующим параметрам: селективность, чувствительность, правильность, прецизионность, воспроизводимость и стабильность. Это первая методика количественного определения ГИЖ-290 в биожидкости, которая может быть применена для доклинических фармакокинетических исследований.

Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГИЖ-290 (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Россия), серия 300920. ГИЖ-290 – 2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты.

Органические растворители имели квалификацию «для хроматографии»: этилацетат («Merck», ФРГ), метанол («Acros Organics», Россия), ацетонитрил («J.T. Baker», США), диэтиловый эфир («Acros Organics», Россия). Все другие реактивы и растворители имели квалификацию «ч.д.а.».

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества / Calibration Standards and Quality control samples

Матричный раствор ГИЖ-290 (1 мг/мл) готовили на метаноле. Рабочие стандартные растворы требуемой концентрации для построения калибровочных кривых и образцов контроля качества (КК) готовили путём серийных разведений в смеси метанол:вода (50:50, об/об). Все растворы до их использования хранили при –24 °С.

Растворы для построения калибровочных кривых ГИЖ-290 готовили внесением рабочего стандартного раствора, эквивалентного 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 нг/мл исследуемого вещества, в интактную плазму крови крыс. Образцы КК также готовили на плазме крови (10, 50, 250, 750 нг/мл).

В настоящей методике биоматрицей для приготовления стандартных растворов служила плазма крови крыс с массой тела 180–220 г, полученных из питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская обл.). Образцы крови получали методом декапитации интактных животных. Плазму крови получали центрифугированием образцов цельной крови при 3500 об/мин в течение 10 мин. Образцы плазмы крови крыс хранили при –50 °С.

Приборы и условия хроматографирования / Equipment and chromatography conditions

Исследование выполнено с использованием соёмщённой системы высокоэффективного жидкостного хроматографа «Agilent 1200» («Agilent», США), с масс-селективным детектором типа «ионная ловушка» модели «Agilent 6310 Series LC/MSD Ion Trap» («Agilent», США). Система состоит из дегазатора подвижной фазы, бинарного насоса, автосемплера, термостата хроматографических колонок. Ионизацию молекул соединения ГИЖ-290 проводили в режиме положительной ионизации молекул на электроспрее при атмосферном давлении. Управление системой ВЭЖХ-МС осуществлялось компьютером с системой обработки данных «ChemStation» (v.1.0).

В работе использовали хроматографическую колонку «Agilent Zorbax Eclipse XDB-CN» (150×2,1 мм; зернение 5 мкм) с предколонкой «Zorbax Eclipse XDB-CN» (12,5×2,1 мм; зернение 5 мкм). Температура термостата хроматографической колонки составляла 40 °С.

Хроматографирование проводили в изократическом режиме в подвижной фазе, состоящей из раствора «А» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили до общего объёма 1 л водой деионизованной) и раствора «Б» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили до общего объёма 1 л ацетонитрилом). Воду деионизованную получали на установке «Водолей-М» (НПО «Химэлектроника», Россия). Соотношение компонентов «А»:«Б» – 70:30. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,35 мл/мин. В инжектор хроматографа вводили 10 мкл анализируемой смеси.

Пробоподготовка / Sample preparation

Образцы плазмы крови, хранящиеся в морозильной камере при –50 °С, размораживали при комнатной температуре. 0,1 мл плазмы крови переносили в экстракционную пробирку, прибавляли 2,0 мл диэтилового эфира и помещали на горизонтальный встряхиватель на 10 мин. Далее органический слой переносили в другую пробирку и упаривали досуха в токе азота при 40 °С на водяной бане. Сухой остаток растворяли в 0,1 мл подвижной фазы. Для анализа использовали 10 мкл надосадочной жидкости.

Валидация / Validation

Аналитическую методику определения ГИЖ-290 валидировали по следующим показателям: селективность, линейность, правильность и прецизионность. Для оценки влияния мешающих определению веществ и селективности анализировали экстракт, полученный от 6 различных животных. Калибровочные кривые строили методом линейной регрессии, откладывая по оси ординат (у) площадь хроматографического пика ГИЖ-290 к его концентрации (ось абсцисс – х) в нг/мл. Нижний предел детектирования рассчитывали как 3-кратное отношение «сигнал–шум». Нижний предел

количественного определения (НПКО) оценивали как наименьшую концентрацию, которую можно было обчислить с приемлемой прецизионностью (не выше 20 %).

Прецизионность и правильность методики оценивали, анализируя образцы (25, 50, 500 и 750 нг/мл) в течение 1 и 3 дней, соответственно.

Процент отклонения среднего от рассчитанных концентраций выражали в виде относительной ошибки RE. Прецизионность выражали в виде относительного стандартного отклонения (RSD). Критерии приемлемости оценивали в соответствии с требованиями ЕАЭС, ЕМА и FDA [9–12].

Эффект матрицы и процент извлечения / Matrix effect and recovery

Для определения эффекта матрицы образцы, подвергшиеся процедуре пробоподготовки, сравнивали с рабочими стандартными растворами в тех же концентрациях. Процент извлечения определяли сравнением площадей пиков исследуемого вещества, внесённого до экстракции с рабочими стандартными растворами ГИЖ-290. Каждый образец анализировали по 6 раз.

Стабильность / Stability

Исследование стабильности ГИЖ-290 в плазме крови крыс проводили, анализируя три концентрации КК (50, 250 и 750 нг/мл). Краткосрочная стабильность включала: а) стабильность в течение 3 циклов «заморозка–разморозка»; б) выдерживание образцов при комнатной температуре в течение рабочего дня и в) выдерживание образцов после пробоподготовки при комнатной температуре в подвижной фазе в течение рабочего дня. Долговременную стабильность оценивали выдерживанием образцов при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 суток.

Результаты и обсуждение / Results of the study

Детектирование в MRM-режиме обеспечивает очень специфичный и чувствительный отклик на исследуемое вещество. Для ГИЖ-290 отмечается масс-спектрометрический отклик как в положительном, так и отрицательном режимах ионизации. Однако интенсивность сигнала в положительном режиме значительно выше по сравнению с отрицательным. ГИЖ-290 соответствовал родительский молекулярный ион $[M+H]^+$ равный 323. Для количественного определения аналита использовали MRM-режим, обеспечивающий лучшую селективность и чувствительность.

Для подтверждения правильной идентификации и во избежание ложноположительных результатов было выбрано два различных дочерних иона, и отношение площадей пиков этих ионов (количественного и подтверждающего) сравнивали с площадями стандартного образца ГИЖ-290.

На рис. 1 представлена структура и продукты фрагментации ГИЖ-290, а также типичный масс-спектр родительского и дочерних молекулярных ионов. В качестве основного молекулярного иона для количественного анализа использовали ион с m/z 174 и в качестве подтверждающего — m/z 202.

Хроматографическое разделение проводили на колонке «Agilent Zorbax Eclipse XDB-CN», обеспечивающую отличную форму пика, эффективность разделения, приемлемую линейность и воспроизводимость на фоне эндогенных соединений. Оптимизацию состава подвижной фазы проводили исходя из селективности пика аналита и его времени удерживания.

Снижение доли органического растворителя привело к сужению пика ГИЖ-290 и уменьшению времени удерживания. В описанных ранее условиях время

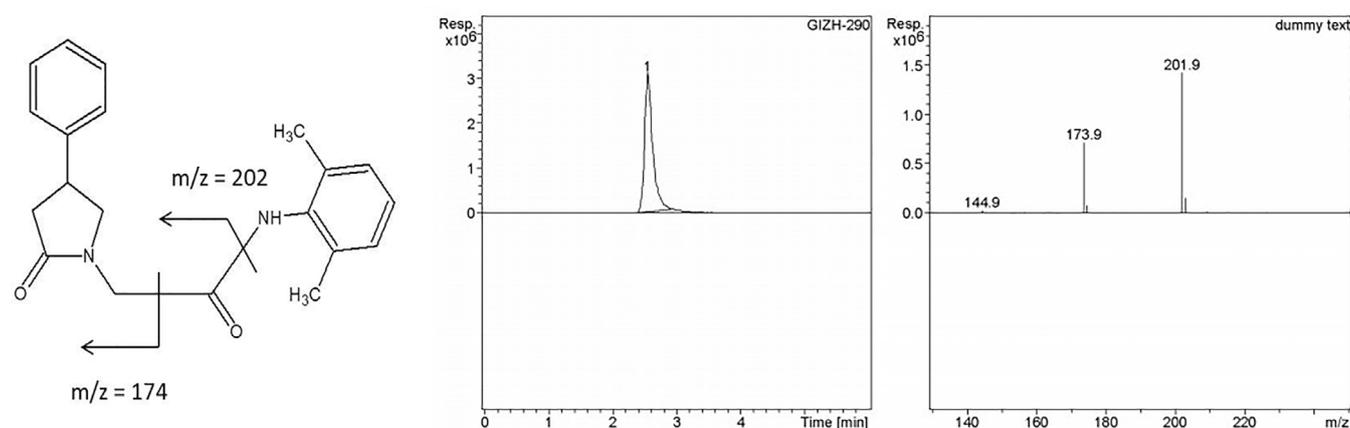


Рис. 1. Структура и фрагментация молекулы ГИЖ-290
Figure 1. Structure and fragmentation of GIZh-290 molecule

удерживания аналита составило 2,6 мин. На рис. 2 представлены хроматограммы интактной плазмы крови и плазмы крови крысы, содержащей 10 нг/мл (НПКО) ГИЖ-290.

Пробоподготовка / Sample preparation

В качестве метода извлечения исследуемого вещества из биоматрицы использовали ЖЖЭ. Выбор метода основывался на его эффективности, специфичности и низкой стоимости по сравнению с твёрдофазной экстракцией. В качестве экстрагентов использовали этилацетат, метиленхлорид и диэтиловый эфир. Этилацетат и метиленхлорид продемонстрировали относительно низкую экстракционную эффективность (процент экстракции 60 и 45 %, соответственно). Диэтиловый эфир проявил себя как наиболее эффективный экстрагент для извлечения ГИЖ-290 (процент экстракции 79 %).

Несмотря на то что полярный растворитель способен экстрагировать полярные примеси, это никак не повлияло на стабильность базовой линии. На экс-

тракцию одной пробы требовалось не более 20 мин и 2 мл диэтилового эфира из 0,1 мл плазмы крови.

Валидация и эффект матрицы / Validation and matrix effect

Типичные MRM-хроматограммы интактной плазмы крови и НПКО образца представлены на рис. 2. Из рис. 2 видно, что эндогенные вещества не влияли на время удерживания ГИЖ-290.

Калибровочные кривые ГИЖ-290 получали линейным регрессионным анализом наименьших квадратов в диапазоне 10–1000 нг/мл. Для количественного анализа использовали взвешенную регрессию (1/x). Коэффициенты корреляции (r) для стандартных кривых из различных источников плазмы крови равнялись 0,999, демонстрируя отличную линейность.

Воспроизводимость внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности (табл. 1).

Как видно из табл. 1 правильность внутри одного цикла колебалась от 0,15 до 9,83 % (определяли, как

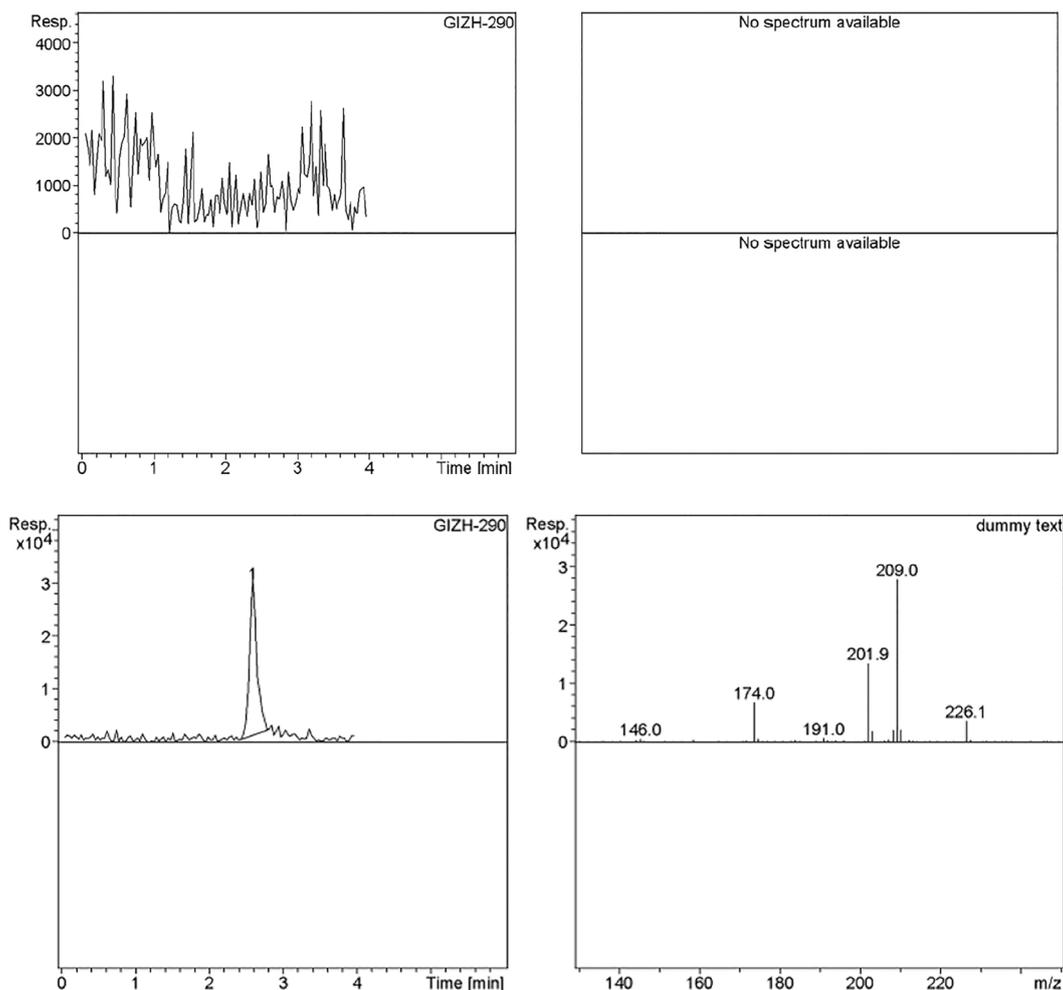


Рис. 2. Хроматограммы и масс-спектр: а) интактной плазмы крови; б) НПКО ГИЖ-290 в плазме крови (10 нг/мл)
Figure 2. Chromatograms and mass-spectrum: a) blank blood plasma; b) LLOQ GIZh-290 in the blood plasma (10 ng/ml)

Таблица 1

Воспроизводимость и правильность ГИЖ-290 в плазме крови крыс ($n = 6$)

Table 1

Reproducibility and accuracy of GIZh-290 in rat blood plasma ($n = 6$)

Теоретическая концентрация, нг/мл / Theoretical concentration, ng/ml	Внутри цикла найдено, нг/мл / Intra cycle, Found ng/ml	RSD %	RE %	Между циклами найдено, нг/мл / Inter cycles Found ng/ml	RSD %	RE %
10	9,02	16,83	-9,83	10,31	19,32	12,14
50	49,57	5,01	-0,87	51,13	7,58	2,09
250	248,72	3,70	0,51	249,24	5,11	-1,57
750	758,42	3,41	-0,15	743,28	6,18	-0,41

Примечания: RSD = (SD концентрации/средняя концентрация) ×100 %; RE = (рассчитанная концентрация – теоретическая концентрация)/теоретическая концентрация ×100 %.
Notes: RSD = (SD concentration/mean concentration) ×100 %; RE = (estimated concentration–theoretical concentration)/theoretical concentration ×100 %.

RE) с RSD в диапазоне от 3,41 до 16,83 %. Правильность между рабочими циклами изменялась от 0,41 до 12,41 % с RSD в диапазоне от 5,11 до 19,32 %, демонстрируя приемлемую правильность.

Считается, что эффект матрицы (ЭМ) обусловлен коэлюированием, снижением или усилением интенсивности иона аналита. Средние матричные эффекты ГИЖ-290 в концентрациях 10, 50, 250 и 750 нг/мл составили 95,23; 106,08; 89,37 и 95,26 %, а средний процент экстракции для этих концентраций – 79,85; 78,09; 80,80 и 77,82 %, соответственно (табл. 2).

Чтобы оценить эффективность обработки проб, стандарты, вносимые в плазму крови до экстракции, сравнивали со стандартами, приготовленными на подвижной фазе. Эффективность обработки проб ГИЖ-290 составила 78,31–83,15 %. Чувствительность разработанной методики достаточно высокая, чтобы

её можно было использовать в дальнейших фармакокинетических исследованиях.

Стабильность / Stability

Стабильность ГИЖ-290 изучали на образцах КК в различных условиях хранения. Матричный раствор аналита в метаноле был стабилен при -24 °С в течение 30 суток.

В табл. 3 представлены результаты изучения стабильности ГИЖ-290 в плазме крови. Не отмечено значимого отличия между кратковременным и долгосрочным хранением аналита при -50 °С.

Три цикла «заморозки–разморозки» и пост-препаративная стабильность незначительно повлияли на количественное содержание ГИЖ-290 в образцах. Концентрация ГИЖ-290 при хранении образцов при комнатной температуре в течение рабочего дня практически не снижалась. Стабильность исследуемого

Таблица 2

Процент извлечения, эффект матрицы и эффективность обработки ($n = 6$)

Table 2

Recovery, matrix effect and process efficiency ($n = 6$)

Концентрация, нг/мл / Concentration ng/ml	ЭМ, % а) / Matrix effect	Процент извлечения, % б) / Recovery	Эффективность обработки, % в) / Process efficiency
10	95,23	79,85	81,07
50	106,08	78,09	83,15
250	89,37	80,80	79,26
750	95,26	77,82	78,31

Примечания: а) ЭМ оценивали как отношение средней площади пика аналита, добавленного после экстракции, к средней площади пика аналита стандартного образца, умноженного на 100; б) процент экстракции рассчитывали как отношение средней площади пика аналита, добавленного до экстракции, к средней площади пика аналита добавленного после экстракции, умноженного на 100; в) эффективность обработки рассчитывали как отношение средней площади пика аналита, добавленного до экстракции, к средней площади пика стандартного образца аналита, умноженного на 100.
Notes: a) the ME was estimated as the ratio of the average peak area of the analyte added after extraction to the average peak area of the analyte of the standard sample multiplied by 100; b) the extraction percentage was calculated as the ratio of the average peak area of the analyte added before extraction to the average peak area of the analyte added after extraction multiplied by 100; c) the processing efficiency was calculated as the ratio of the average peak area of the analyte added before extraction to the average peak area of the standard analyte sample multiplied by 100.

Таблица 3

Стабильность ГИЖ-290 в плазме крови крыс ($n = 6$)

Table 3

Stability of GIZh-290 in rat plasma ($n = 6$)

Условия хранения / Storage conditions	50 нг/мл			250 нг/мл			750 нг/мл		
		RSD, %	RE, %		RSD, %	RE, %		RSD, %	RE, %
Краткосрочное хранение / Short-time storage:									
а а	47,37	6,11	-1,09	238,54	4,26	-3,15	762,23	3,32	3,65
б b	48,12	7,04	-0,91	231,44	5,18	-1,29	737,83	4,02	-0,62
в c	47,89	5,72	-2,32	240,06	3,78	-1,89	722,69	3,44	-0,97
Долговременное хранение / Long-time storage:									
г d	48,73	5,13	-1,71	237,23	3,68	-2,08	758,62	2,47	1,07

Примечания: а) стабильность в течение 3 циклов «заморозка—разморозка»; б) выдерживание образцов при комнатной температуре в течение рабочего дня; в) выдерживание образцов после пробоподготовки при комнатной температуре в подвижной фазе в течение рабочего дня; г) выдерживание образцов при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 суток.
Notes: a) stability for 3 “freezing-defrost” cycles; b) samples storage at ambient temperature for working day; c) samples storage after preparation at ambient temperature in mobile phase for working day; d) samples storage at $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 days.

вещества в течение рабочего дня колебалась от 98,11 до 99,01 %. Поэтому пробы плазмы крови, содержащие ГИЖ-290, можно хранить в течение рабочего дня при комнатной температуре.

Заключение / Conclusions

Разработана и валидирована чувствительная и селективная ВЭЖХ-МС методика определения нового потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови. Для экстракции аналита

использовали ЖЖЭ. Валидацию методики проводили исходя из её селективности, линейности, правильности, прецизионности и стабильности. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции равным 0,999. Процент извлечения ГИЖ-290 из плазмы крови в среднем составил 79,2 %. Правильность в течение рабочего цикла и между циклами была $\leq 19,32\%$ и прецизионность $\leq 12,14\%$. Установлено, что образцы плазмы крови, содержащие ГИЖ-290, можно хранить при комнатной температуре в течение рабочего дня.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бочков Павел Олегович

e-mail: bok-of@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>

SPIN-код: 5576-8174

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени

В.В. Закусова», Москва, Россия

Bochkov Pavel O.

e-mail: bok-of@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>

SPIN code: 5576-8174

PhD in Biology, Senior Research Officer of labora-

tory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of

Pharmacology», Moscow, Russia

Хрустова Ирина Павловна

e-mail: iphrustova@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0277-3595>

SPIN-код: 7304-5377

Лаборант-исследователь лаборатории

фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фарма-

кологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Khrustova Irina P.

e-mail: iphrustova@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0277-3595>

SPIN code: 7304-5377

Research Laboratory Assistant of laboratory phar-

macokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharma-

cology», Moscow, Russia

Литвин Александр Алексеевич
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: litbiopharm@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
 SPIN-код: 6193-5770
 д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
 В.В. Закусова», Москва, Россия

Колыванов Геннадий Борисович
 e-mail: 7822535@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
 SPIN-код: 2538-8639
 д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
 В.В. Закусова», Москва, Россия

Шевченко Роман Владимирович
 e-mail: rmn.shev@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4646-7733>
 SPIN-код: 1844-6202
 к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
 В.В. Закусова», Москва, Россия

Жердев Владимир Павлович
 e-mail: zherdevpharm@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>
 SPIN-код: 2213-9592
 д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
 фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фарма-
 кологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Litvin Alexander A.
 Corresponding author
 e-mail: litbiopharm@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
 SPIN code: 6193-5770
 D. Sci. in Biology, Leading researcher of the labo-
 ratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov insti-
 tute of Pharmacology», Moscow, Russia

Kolyvanov Gennadiy B.
 e-mail: 7822535@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
 SPIN code: 2538-8639
 D. Sci. in Biology, Leading researcher of the labo-
 ratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov insti-
 tute of Pharmacology», Moscow, Russia

Shevchenko Roman V.
 e-mail: rmn.shev@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4646-7733>
 SPIN code: 1844-6202
 PhD in Medicine, Research Officer of laboratory
 pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of
 Pharmacology», Moscow, Russia

Zherdev Vladimir P.
 e-mail: zherdevpharm@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>
 SPIN code: 2213-9592
 D. Sci. in Medicine, professor, Head of labora-
 tory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of
 Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Жмуренко Л.А., Литвинова С.А., Мокров Г.В., Ковалев И.Г., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. Синтез, противосудорожная и ноотропная активность производных 4-фенилпирролидона. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(5):20–27. [Zhurenko LA, Litvinova SA, Mokrov GV, Kovalev IG, Voronina TA, Nerobkova LN, Gudasheva TA. Synthesis of 4-phenylpyrrolidone derivatives with anticonvulsant and nootropic activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(5):20–27. (In Russ).]. DOI:10.30906/0023-1134-2019-53-5-20-27.
2. Ковалев И.Г. Поиск соединений с противосудорожной активностью среди новых производных 4-фенилпирролидона и кумарина и изучение их нейрхимических механизмов действия: Дис. ... канд. мед. наук. — М.: 2017. [Kovalev IG. Search for compounds with anticonvulsant activity among new derivatives of 4-phenylpyrrolidone and coumarin and study of their neurochemical mechanisms of action. [dissertation] Moscow: 2017. (In Russ).]. Доступно по: https://www.academpharm.ru/images/upload/ru/1510/Dissertaciya_Kovalev_I.G.pdf.
3. Ковалёв И.Г., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветирacetама и пирacetама. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017;80(6):13–18. [Kovalev IG, Voronina TA, Litvinova SA, Zhurenko LA, Mokrov G V.

Comparison of anticonvulsant and mnemotropic properties of new derivatives of 4-phenylpyrrolidone, levetiracetam and piracetam. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2017;80(6):13–18. (In Russ).]. DOI:10.30906/0869-2092-2017-80-6-13-18.

4. Srinivas NR. Applicability of bioanalysis of multiple analytes in drug discovery and development: review of select case studies including assay development considerations. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(5):383-414. DOI: 10.1002/bmc.594
5. Hopfgartner G, Bourgoigne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2003;22(3):195–214. DOI: 10.1002/mas.10050.
6. Chao Zhang, Lu Wang, Yan Yang, Yantong Sun, Jie Zhang, Guoqing Li, Jingkai Gu. Validated LC–MS/MS method for the determination of sarpogrelate in human plasma: Application to a pharmacokinetic and bioequivalence study in Chinese volunteers. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;53(3):546–551. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.03.025.
7. Gillespie TA, Winger BE. Mass spectrometry for small molecule pharmaceutical product development: a review. *Mass Spectrom Rev*. 2011;30(3):479–490. DOI: 10.1002/mas.20289.
8. Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug. *Mass Spectrom Rev*. 1999;18(3-4):187–279. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:3/4<187:AID-MAS2>3.0.CO;2-K.

9. Изучение биоэквивалентности воспроизведённых лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К; 2013 — 328 с. [Izuchenie bioekvivalentnosti vosproizvedennykh lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom I. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).].

10. Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 №85. [Rukovodstva po ekspertize lekarstvennykh sredstv Tom I, pravil provedeniya

issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza, Sovet Evraziiskoi ekonomicheskoi komissi, reshenie ot 3 noyabrya 2016 №85. (In Russ).].

11. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018, 41 P.

12. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011, 23 P.