

Количественное определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бойко С. С., Жердев В. П.

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

Аннотация. ГИЖ-298 – новое производное 4-фенилпирролидона, обладающее противосудорожным и ноотропным действием. Разработана и валидирована селективная и чувствительная ВЭЖХ-МС методика количественного определения ГИЖ-298 в плазме крови крыс. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции ($>0,99$). Процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови в среднем составил $73,4 \pm 3,4$ %. Правильность в течение одного рабочего цикла и между циклами была $\leq 4,01$ %, прецизионность $\leq 8,03$ %. Изучение стабильности ГИЖ-298 выявило, что исследуемое соединение устойчиво в биоматрице при комнатной температуре (4 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (8°C) в течение аналитического эксперимента, при длительном хранении при -50°C в течение 30 суток, а также если подвергается нескольким циклам замораживания / размораживания (3 цикла). Изучена фармакокинетика ГИЖ-298 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 60 мг/кг.

Ключевые слова: ГИЖ-298; высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия; плазма крови; валидация методики

Для цитирования:

Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бойко С. С., Жердев В. П. Количественное определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):37–45. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-37-45>

Поступила: 19 сентября 2022 г. **Принята:** 21 сентября 2022 г. **Опубликована:** 24 октября 2022 г.

Quantification of a potential anticonvulsant drug GIZh-298 in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry

Bochkov PO, Kravtsova OYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, Boyko SS, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. GIZh-298 is a new derivative of 4-phenylpyrrolidone with anticonvulsant and nootropic effects. A selective and sensitive HPLC-MS technique for the quantitative determination of GIZh-298 in rat blood plasma has been developed and validated. The linearity of the technique was confirmed by a high correlation coefficient ($>0,99$). Recovery of GIZh-298 from blood plasma averaged 73.4 ± 3.4 %. Accuracy during one working cycle and between cycles was ≤ 4.01 %, precision ≤ 8.03 %. The study of the stability of GIZh-298 revealed that the target compound is stable in a biomatrix at room temperature (4 h), when it is in a thermostatically controlled autosampler (8°C) during an analytical experiment, with prolonged storage at -50°C for 30 days, and also if it is subjected to several freeze-thaw cycles (3 cycle). The pharmacokinetics of GIZh-298 in rat blood plasma after a single intravenous injection at a dose of 60 mg/kg was studied.

Keywords: GIZh-298; HPLC–MS; rat plasma; method validation

For citations:

Bochkov PO, Kravtsova OYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, Boyko SS, Zherdev VP. Quantification of a potential anticonvulsant drug GIZh-298 in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):37–45. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-37-45>

Received: September 19, 2022. **Accepted:** September 21, 2022. **Published:** October 24, 2022.

Введение / Introduction

ГИЖ-298 – новое производное оксима 4-бензоилпирридина, синтезированное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» [1]. Это соединение обладает противосудорожной активностью, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком и коразолом в дозах 0,5–100 мг/кг у грызунов внутрибрюшинно (в/б). LD_{50} после в/б введения для ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг (мыши). Таким образом, ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту [2]. Установлено, что через 50 мин после однократного в/б введения крысам (60 мг/кг) ГИЖ-298 многократно снижал число продолжительных генерализованных

высокоамплитудных разрядов в ипси-, контрлатеральной коре (в 46 раз), гиппокампе и гипоталамусе (в 28 раз), вызванных гомоцистеином тиалактона, и у 100 % животных устранял генерализованные тонико-клонические судороги, возникающие в развернутой стадии эпилептического статуса [3].

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного определения ГИЖ-298 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Методику валидировали по следующим параметрам: селективность (специфичность), чувствительность, линейность, правильность, прецизионность, воспроизводимость и стабильность. Это первая методика количественного определения ГИЖ-298 в

биожидакости с масс-спектрометрическим детектированием, которая может быть применена для доклинических фармакокинетических исследований.

Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГИЖ-298 – оксалат О-(2-морфолиноэтил) оксима 4-бензоилпиридина (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия), серия 201021, а также следующие реактивы: ацетонитрил («J. T. Baker», США), вода деионизованная («Panreac», «Applichem», ФРГ), кислота муравьиная 85 % («Acros Organics», РФ).

Оборудование и условия хроматографирования / Equipment and chromatographic conditions

В работе использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Ultimate 3000, Thermo Scientific, США), совмещённую с масс-спектрометрическим (МС) детектором – тип тройной квадруполь (TSQ Altis, Thermo Scientific, США). В составе ВЭЖХ: бинарный четырёхканальный насос, дегазатор подвижной фазы, термостат хроматографических колонок, автосемплер, термостат автосемплера. Для регистрации и обработки данных использовали программное обеспечение Xcalibur v.4.2.28.14 (Thermo Scientific, США).

Хроматографическое разделение проводили на колонке «Agilent HILIC Plus», 2,1×50 мм с размером частиц сорбента 3,5 мкм (температура колонки – 40 °С) в режиме градиентного элюирования: 0,0 мин – 95 % Б; 1,0–2,2 мин – 50 % Б; 2,3–3,5 мин – 95 % Б. Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (Б) и воды деионизованной (А), содержащих 0,1 % кислоты муравьиной (по объёму).

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества / Calibration standards and quality control samples

Матричный раствор ГИЖ-298 (0,1 мг/мл) готовили, растворяя навеску в воде деионизованной. Рабочие стандартные растворы требуемой концентрации для построения калибровочных кривых и образцов контроля качества (КК) были приготовлены путём серийных разведений на воде деионизованной. Все растворы до их использования хранили в холодильнике при 8 °С. Растворы (модельные) для построения калибровочных кривых ГИЖ-298 готовили внесением рабочего стандартного раствора эквивалентного 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл исследуемого вещества в интактную плазму крови крыс. Образцы КК (модельные растворы) также готовили на плазме крови (25, 100, 1000, 2500 нг/мл).

В настоящей методике биоматрицей для приготовления модельных растворов служила плазма крови крыс с массой тела 180–220 г, полученных из

питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» России (Московская обл.). У интактных животных пробы крови отбирали декапитацией в пробирки, содержащие 100 мкл 5 % К₂ЭДТА. Плазму крови отделяли центрифугированием при 3500 об/мин в течение 10 мин, замораживали при –50 °С и хранили без добавления консервантов.

Пробоподготовка / Sample preparation

Пробоподготовку проводили методом осаждения белков плазмы крови органическим растворителем. К 100 мкл образца плазмы крови прибавляли 400 мкл ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали на встряхивателе Vortex в течение 5 с и на платформе горизонтального встряхивателя в течение 15 мин, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин. Отбирали надосадочный слой и переносили в вials хроматографические с дополнительной внутренней вставкой объёмом 250 мкл. Вials помещали в термостатируемое устройство (8 °С) автоматического ввода образцов. Объём вкола составлял 5 мкл.

Валидационные характеристики / Validation characteristics

Аналитическую методику определения ГИЖ-298 валидировали по следующим показателям: селективность (специфичность), чувствительность, линейность, правильность, прецизионность, воспроизводимость и стабильность.

Для оценки влияния мешающих определению веществ и селективности (специфичности) анализировали экстракт плазмы крови, полученный от 6 разных интактных крыс. Для количественного определения целевого соединения строили калибровочные кривые методом линейной регрессии, откладывая по оси ординат (Y) площадь хроматографического пика ГИЖ-298 и по оси абсцисс (X) его концентрации в нг/мл. Нижний предел количественного определения (НПКО) (чувствительность методики) оценивали как наименьшую концентрацию, которую можно было обчислить с приемлемой прецизионностью (≥20 %) и правильностью (80÷120 %). Прецизионность (точность) определяли как относительное стандартное отклонение, RSD (%) по формуле:

$$RSD, \% = \left(\frac{\text{стандартное отклонение, SD}}{\text{среднее, Mean}} \right) \times 100$$

Прецизионность (точность) и правильность методики оценивали, анализируя образцы (25, 100 1000 и 2500 нг/мл) в течение 1 и 3 дней, соответственно.

Правильность выражали в виде отклонения от относительной погрешности, RE: относительная погрешность, % = (Расчётная концентрация × 100) / Теоретическая концентрация

Отклонение правильности, RE % = |относительная погрешность – 100|

Отклонение (как в большую, так и меньшую сторону) расчётной концентрации от теоретической для калибровочных проб и образцов КК должно составлять ≤15 % (отклонение правильности).

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

Критерии приемлемости вышеперечисленных валидационных параметров оценивали в соответствии с требованиями ЕАЭС, ЕМА и FDA [4–7].

Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки / Matrix effect, recovery and process efficiency

Расчёт степени извлечения проводили с использованием площадей хроматографических пиков, полученных при анализе проэкстрагированных модельных растворов ГИЖ-298 (преэкстракционных) и модельных растворов, приготовленных на заранее проэкстрагированной интактной плазме (постэкстракционных). Концентрации ГИЖ-298 в пре- и постэкстракционных спайках: 25, 100, 1000, 2500 нг/мл (приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях).

Для определения эффективности обработки сравнивали результаты анализа преэкстракционных модельных растворов (с концентрациями: 25, 100, 1000, 2500 нг/мл) с результатами анализа водных стандартных растворов ГИЖ-298 с такими же концентрациями (приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях).

Определение эффекта матрицы проводили с использованием площадей хроматографических пиков водных стандартных растворов ГИЖ-298 (с концентрациями: 25, 100, 1000, 2500 нг/мл) и площадей пиков, полученных при анализе постэкстракционных модельных растворов, содержащих целевое соединение в тех же концентрациях (приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях).

Стабильность / Stability

Исследование стабильности ГИЖ-298, которое проводили на образцах КК (концентрации: 25, 100, 1000 нг/мл, приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях), включало:

- а) изучение стабильности при многократном замораживании/размораживании (3 полных цикла замораживания/ размораживания, при –50 °С, цикл = 24 ч);
- б) изучение стабильности при кратковременном хранении (3 ч) модельных растворов при комнатной температуре;
- в) изучение стабильности при нахождении готовых проб в автосемплере (при 8 °С) в течение анализа и дольше, но не более 48 ч;
- г) изучение стабильности при долговременном хранении (30 дней) модельных растворов при –50 °С.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В ходе МС анализа выявлено, что для ГИЖ-298 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-298 соответствовал родительский молекулярный ион [M+H]⁺ равный 312. Для количественного определения аналита использовали MRM-режим (multiple reaction monitoring, режим мониторинга множественных реакций), обеспечивающий лучшую селективность и чувствительность.

На рис. 1 представлена структура и продукты фрагментации ГИЖ-298, а также типичный масс-

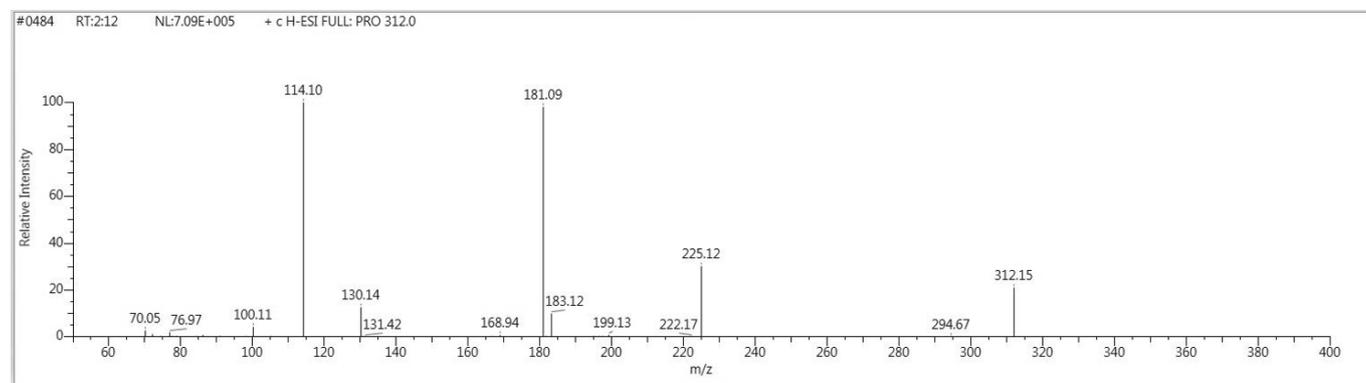
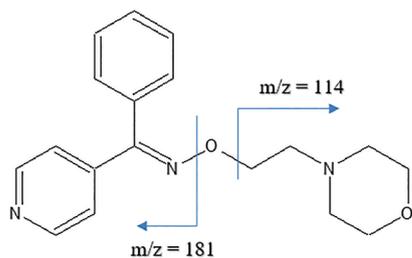


Рис. 1. Структура и фрагментация ГИЖ-298
Fig. 1. Structure and fragmentation of GIZh-298

спектр родительского и дочерних молекулярных ионов. Регистрацию спектров проводили в MRM-режиме по дочерним ионам с отношением массы к заряду $m/z = 114$ и $m/z = 181$, полученным изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с отношением массы к заряду $m/z = 312$ ($[M+H]^+$). Напряжение на капилляре составило 3500 В, температура испарителя 350 °С, температура капилляра переноса ионов составила 325 °С; энергия фрагментации в коллизионной ячейке 20 В. Остальные параметры камеры распылителя были установлены в автоматическом режиме программным обеспечением в соответствии со скоростью потока подвижной фазы.

Хроматографическое разделение проводили на колонке «Agilent HILIC Plus», обеспечивающую нормальную 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. В описанных ранее условиях время удерживания аналита составило 1,5 мин. На рис. 2 представлена хромато-масс-спектрограмма интактной плазмы крови крыс, а на рис. 3 — плазмы крови крысы, содержащей 5 нг/мл ГИЖ-298 (НПКО).

Пробоподготовка / Sample preparation

Выбор метода извлечения исследуемого вещества из биоматрицы основывался на его простоте, низкой стоимости по сравнению с твёрдофазной и жидкость-жидкостной экстракциями и достаточной эффектив-

ности. В качестве осаждающего агента использовали: этиловый, метиловый спирты и ацетонитрил. Ацетонитрил проявил себя как наиболее эффективный и доступный агент для осаждения белков при экстракции ГИЖ-298 (процент извлечения в среднем составил $73,4 \pm 3,4$ %).

Валидационные характеристики / Validation characteristics

Селективность, специфичность / Selectivity, specificity

В результате изучения селективности (специфичности) методики (при анализе 6 интактных (холостых) и 6 модельных растворов ГИЖ-298 с концентрацией 5 нг/мл плазмы) показано, что компоненты биоматрицы не интерферируют с пиком целевого соединения (ни по времени удерживания, ни по величине пика). Типичные хроматограммы интактной плазмы крови и НПКО ГИЖ-298 представлены на рис. 2 и 3.

Количественное определение целевого соединения.

Линейность методики / Quantification. Linearity

Калибровочные кривые ГИЖ-298 получали линейным регрессионным анализом наименьших квадратов. Для количественного анализа использовали взвешенную регрессию (1/x). Характеристики полученных калибровочных кривых представлены в табл. 1.

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики / Low level of quantification (LLOQ)

При построении калибровочных кривых выявлен НПКО (прецизионность 12 % и отклонение правильности $84 \div 115$ %) применяемой методики в плазме крови крыс — 5 нг/мл при соотношении сигнал/шум > 10

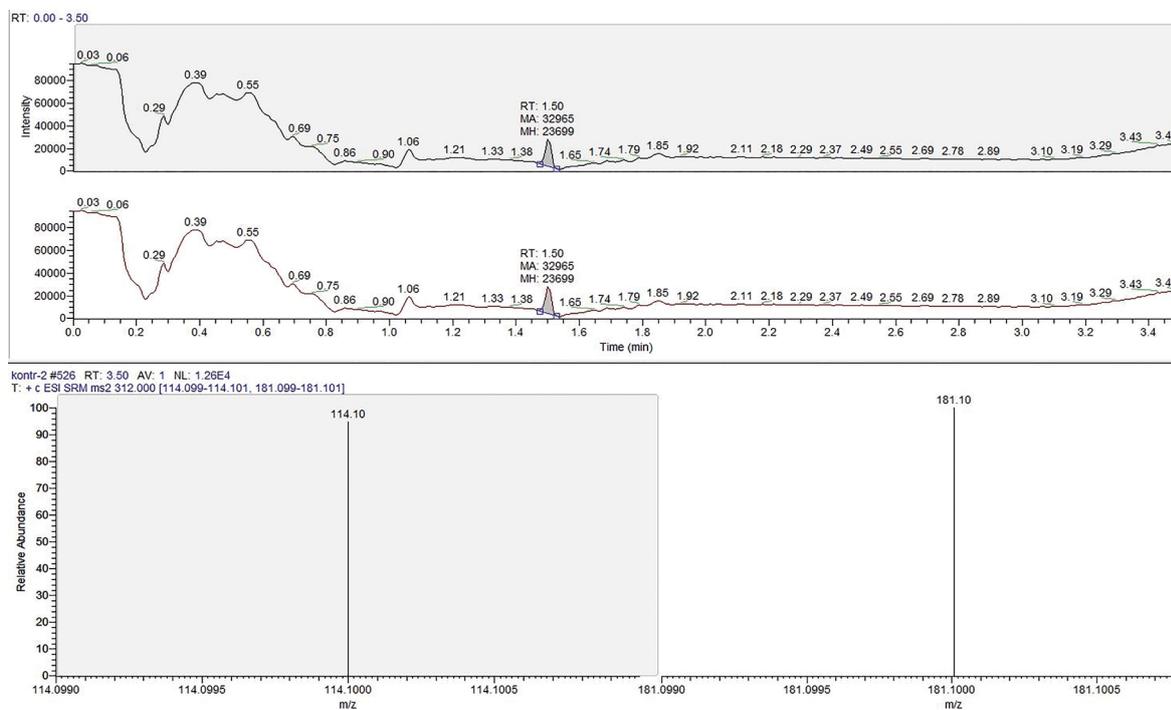


Рис. 2. Хромато-масс-спектрограмма интактной плазмы крови крыс
 Fig. 2. Chromatograms and mass-spectrum of the rat blank blood plasma

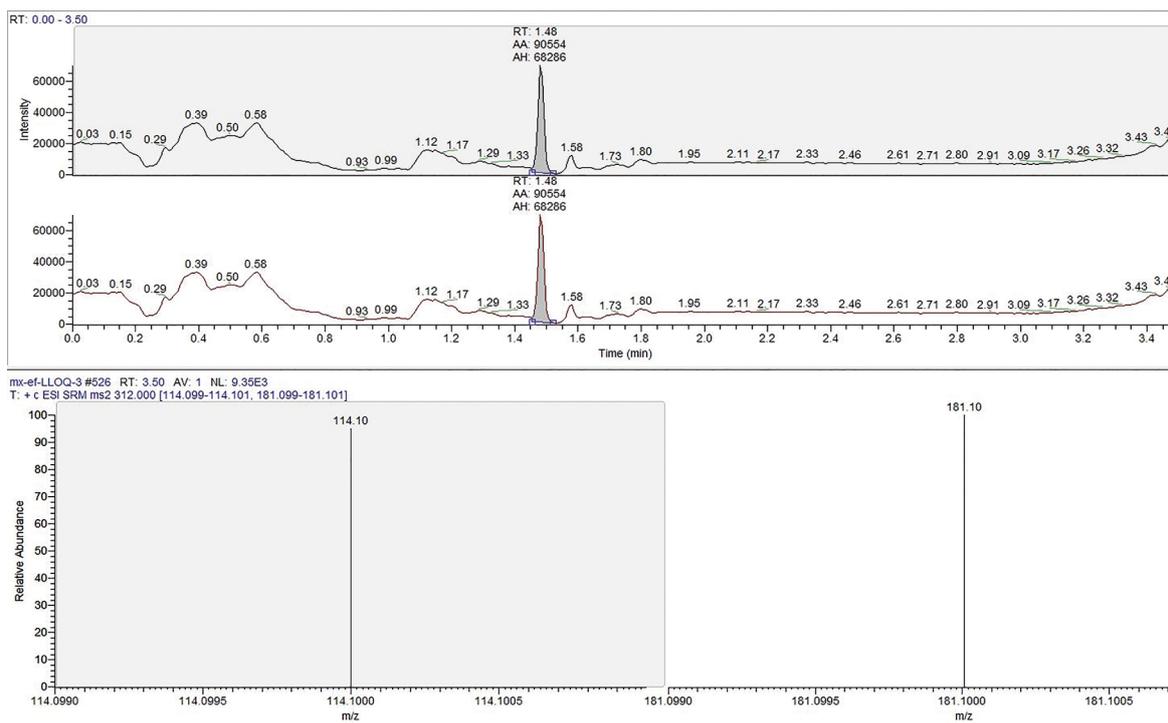


Рис. 3. Хромато-масс-спектрограмма плазмы крови крыс, содержащей ГИЖ-298 в концентрации 5 нг/мл (НПКО)

Fig. 3. Chromatograms and mass-spectrum of GIZh-298 LLOQ = 5 ng/mL of rat blood plasma

Таблица 1

Характеристики калибровочных кривых

Table 1

Calibration curves characteristics

День валидации / Validation day	Уравнение / Equation	Коэффициент корреляции (r) / Correlation coefficient (r)	Диапазон линейности / Linearity range	Количество калибровочных уровней / Number of calibration levels
1-й	$Y = 25146,9 \times X + 23414,4$	0,997	5÷5000	10
2-й	$Y = 22802,8 \times X - 3574,6$	0,998	5÷5000	10
3-й	$Y = 21558,0 \times X - 47162,0$	0,997	5÷5000	10

Примечания: Y – площадь хроматографического пика ГИЖ-298 (условные единицы – cps); X – концентрация ГИЖ-298, нг/мл.
Notes: Y is the GIZh-298 chromatographic peak area of (conventional units – cps); X is the concentration of GIZh-298, ng/ml.

(анализ 6 модельных растворов на плазме из разных источников). На масс-хроматограмме (рис. 3) видно, что пик ГИЖ-298 симметричный, отвечает нормальному распределению, без признаков размытия и раздвоения (площадь пика 82759 ± 8780 cps, высота 64014 ± 5916 counts) со временем удерживания $1,49 \pm 0,01$ мин.

Правильность, прецизионность и воспроизводимость / Accuracy, Precision and Reproducibility

Результаты анализа образцов КК представлены в табл. 2. Правильность (RE) внутри одного цикла (в течение дня) колебалась от 0,38 до 4,10 %, а RSD в диапазоне $1,95 \div 8,03$ %. Правильность между рабочими циклами изменялась от 1,14 до 3,65 %, а RSD

в диапазоне $2,38 \div 10,06$ %, отвечая критериям приемлемости [4–7].

Воспроизводимость внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности (см. табл. 2) и отвечала критериям приемлемости.

Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки / Matrix effect, recovery and process efficiency

Результаты определения эффекта матрицы (ЭМ), степени извлечения и эффективности обработки представлены в таблице 3. Считается, что эффект матрицы определяются коэкстрактивными веществами биоматрицы, которые обуславливают снижение

Таблица 2

Правильность, прецизионность и воспроизводимость ГИЖ-298 в плазме крови крыс ($n = 6$)

Table 2

Accuracy, precision and reproducibility of GIZh-298 in rat blood plasma ($n = 6$)

Теоретическая концентрация, нг/мл / Theoretic conc. ng/ml	Внутри цикла / Within cycle			Между циклами / Between cycles		
	Расчётная концентрация, нг/мл / Calculated conc. ng/ml	RSD %	RE %	Расчётная концентрация, нг/мл / Calculated conc. ng/ml	RSD %	RE %
25	24,9	5,64	0,38	25,59	10,06	2,36
100	104,1	2,40	4,10	103,65	3,22	3,65
1000	975,9	1,95	2,41	1011,53	2,38	1,15
2500	2563,6	8,03	2,54	2528,48	5,12	1,14

или усиление интенсивности ионизации целевого соединения. В среднем, ЭМ (плазма крови крыс) на ГИЖ-298 составил $93,0 \pm 1,2$ %. Степень извлечения (процент экстракции) составила в среднем $73,4 \pm 3,4$ %, а эффективность обработки – $70,1 \pm 2,0$ % (табл. 3).

Таблица 3

Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки ($n = 6$)

Table 3

Matrix effect, Recovery, and Process efficiency ($n = 6$)

Концентрация, нг/мл / Concentration ng/ml	ЭМ, % / EM, %	Процент извлечения, % / Recovery, %	Эффективность обработки, % / Process efficiency, %
25	92,3	69,7	67,9
100	91,8	72,1	69,2
1000	94,5	73,8	71,03
2500	93,3	77,82	72,4
Mean	93,0	73,4	70,1
SD	1,2	3,4	2,0

Таким образом, результаты осаждения белков плазмы ацетонитрилом (как метода пробоподготовки) свидетельствуют о достаточной степени извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови крыс.

Стабильность / Stability

Стабильность ГИЖ-298 изучали на образцах КК в различных условиях хранения. Матричный раствор аналита в метаноле был стабилен при -24 °С в течение 30 суток.

В результате изучения стабильности ГИЖ-298 при многократном замораживании (при -50 °С), а именно после трёх полных циклов замораживания/размораживания выявлено, что содержание анализируемого соединения в модельных растворах на плазме не снижалось (табл. 4).

Данные, полученные в ходе исследования стабильности ГИЖ-298 при разных сроках и температурных условиях хранения (кратковременная стабильность в течение 3 ч при комнатной температуре, в течение 24 ч при нахождении в термостатируемом автосемплере (8 °С), долговременная стабильность при хранении в течение 4 недель при -50 °С), демонстрируют устойчивость целевого соединения к распаду во времени при его нахождении в биологическом материале.

Разработанная методика определения ГИЖ-298 в плазме крови крыс была применена для изучения его фармакокинетики.

Изучение фармакокинетики соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс проводилось после его однократного внутривенного введения (в/в) в дозе 60 мг/кг. Введение крысам в/в раствора фармацевтической

Таблица 4

Стабильность ГИЖ-298 в плазме крови крыс ($n = 6$)

Table 4

GIZh-298 stability in rat plasma ($n = 6$)

Условия хранения / Storage conditions	25 нг/мл			100 нг/мл			1000 нг/мл		
	Mean	RSD, %	RE, %	Mean	RSD, %	RE, %	Mean	RSD, %	RE, %
а	25,55	10,64	2,21	96,34	8,23	3,66	1018,8	8,54	1,88
б	23,85	8,59	4,60	91,26	12,13	8,74	1027,0	4,85	2,70
в	23,32	10,60	6,68	90,08	11,42	9,92	1034,4	4,44	3,44
г	25,35	8,77	1,39	95,48	6,23	4,52	1049,0	3,71	4,90

Примечание: условия хранения описаны в разделе «Материалы и методы».

Note: storage conditions are described in the section “Materials and methods”.

субстанции ГИЖ-298 в воде дистиллированной с добавлением 1 капли твина-80 выполняли с помощью шприца. Для определения ГИЖ-298 в плазме крови после его в/в введения образцы крови отбирали до введения (контроль) и через 5, 15, 30, 45 мин, 1,0, 2,0, и 4,0 ч после введения.

Усреднённый фармакокинетический профиль соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс представлен на рис. 4.

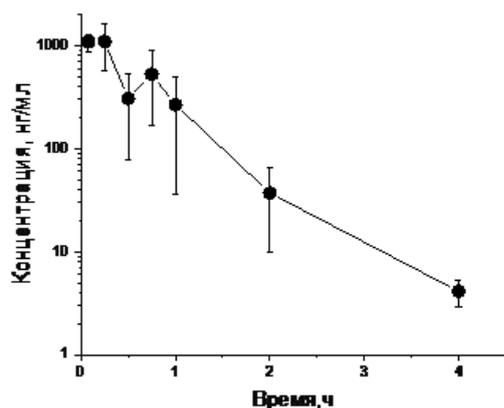


Рис. 4. Фармакокинетическая кривая ГИЖ-298 в плазме крови крыс после однократного в/в введения фармацевтической субстанции в дозе 60 мг/кг ($n = 6$; Mean \pm SD)

Fig. 4. Pharmacokinetic profile of the GIZh-298 in rat blood plasma after a single i/v injection of a pharmaceutical substance at a dose of 60 mg/kg ($n = 6$; Mean \pm SD)

Из рис. 4 видно, что снижение концентраций исследуемого соединения в плазме крови носит моноэкспоненциальный характер. Поскольку на каждую временную точку использовали по 6 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. Фармакокинетические параметры исследуемого соединения в плазме крови животных после однократного в/в введения представлены в табл. 5.

Соединение ГИЖ-298 определяется в плазме крови на протяжении 4 ч. Кажущаяся начальная концентрация (C_0) ГИЖ-298 в плазме крови крыс составила 1402 нг/мл. Учитывая, что период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) составил 0,48 ч, соединение ГИЖ-298 можно отнести к группе «короткоживущих» лекарственных веществ. Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$ и среднее время удерживания вещества в организме (MRT – 0,64 ч) указывают на относительно короткое нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Величина кажущегося объёма распределения (V_d) ГИЖ-298 после в/в введения составила 8,71 л/кг. V_d обычно не эквивалентен физиологическому объёму, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так,

Таблица 5

Фармакокинетические параметры соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения фармацевтической субстанции (60 мг/кг)

Table 5

Pharmacokinetic parameters of GIZh-298 in rat blood plasma after a single intravenous injection of a pharmaceutical substance (60 mg/kg)

Параметр / Parameter of the	Единицы измерения / unit of measurement	Значения параметра / parameter value
C_0	нг/мл	1 402
$AUC_{0 \rightarrow t}$	нг/мл \times ч	787
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	нг/мл \times ч	790
Cl	л/ч/кг	211
V_d	л/кг	8,71
$t_{1/2el}$	ч	0,48
k_{el}	ч ⁻¹	1,444
MRT	ч	0,65

если препарат связывается преимущественно белками крови, V_d будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d над реальным объёмом. В нашем случае, расчёт величины V_d дал высокие значения, указывающие на то, что ГИЖ-298 распределяется во внесосудистом пространстве (органах) животных и накапливается в тканях [8].

Заключение / Conclusion

Разработана и валидирована селективная и чувствительная ВЭЖХ-МС методика количественного определения нового потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции ($>0,99$). Процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови в среднем составил $73,4 \pm 3,4$ %. Правильность в течение одного рабочего цикла и между циклами была $\leq 4,01$ %, прецизионность $\leq 8,03$ %. Изучение стабильности ГИЖ-298 выявило, что целевое соединение устойчиво в биоматрице при комнатной температуре (4 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (8 °C) в течение аналитического эксперимента, при длительном хранении при -50 °C в течение 30 суток, а также если подвергается нескольким циклам замораживания/ размораживания (3 цикла).

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанной методики делают её подходящей для фармакокинетических исследований, а именно для количественного определения концентраций ГИЖ-298 в плазме крови после однократного в/в введения в дозе 60 мг/кг.

Конфликт интересов. Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Conflict of interest. The authors of the article confirmed the absence of a conflict of interest, which must be reported.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

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. Заку-
 сова», Москва, Россия

Кравцова Оксана Юрьевна

e-mail: oukravtsova@yahoo.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>
 SPIN-код: 1733-2330
 к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заку-
 сова», 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. Заку-
 сова», Москва, Россия

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. Заку-
 сова», Москва, Россия

Бойко Светлана Семёновна

e-mail: svboyko@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2177-2010>
 SPIN-код: 4176-8921
 к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

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 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, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Officer
 of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
 Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Kravtsova Oksana Yu.

e-mail: oukravtsova@yahoo.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>
 SPIN code: 1733-2330
 PhD, Cand. Sci. (Biology), researcher scientist of
 pharmacokinetics laboratory 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
 Dr. Sci. in Biology, Leading researcher of the labo-
 ratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute
 of Pharmacology», Moscow, Russia

Litvin Alexander A.

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

Boyko Svetlana S.

e-mail: svboyko@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2177-2010>
 SPIN code: 4176-8921
 PhD, Cand. Sci. (Biology), research officer of labo-
 ratory 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
 Dr. Sci. (Med.), professor, Head of laboratory phar-
 macokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharma-
 cology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Дурнев А.Д., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. Патент РФ № 2643091 от 31.01.2018 «Производные оксимов 4-бензоилпиридина, обладающие противосудорожной активностью, как средства лечения эпилепсии и пароксизмальных состояний». [Durnev AD, Voronina TA, Litvinova SA, Nerobkova LN, Gajdukov IO, Gudasheva TA, Zhmurenko LA, Mokrov GV. Pat. RF № 2643091 31.01.2018 4-benzoylpyridine oxime derivatives having anticonvulsant activity as agents for treatment of epilepsy and paroxysmal states (In Russ).]. URL: <https://patent.ru/patent/RU2643091C2>. Ссылка активна на 15.09.2022
2. Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Л.Н., Литвинова С.А., Гайдуков И.О., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017;(1):22–26. [Zhmurenko LA, Mokrov GV, Nerobkova LN, Litvinova SA, Gaydukov IO, Voronina TA, Gudasheva TA. Novel 4-benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with anti-convulsant activity. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2017;(1):22–26. (In Russ).].
3. Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Авакян Г.Г., Кутепова И.С. Исследование противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) и вальпроевой кислоты на модели эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным очагом. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2017;9(2):57–66. [Gaydukov IO, Litvinova SA, Voronina TA, Nerobkova LN, Zhmurenko LA, Mokrov GV, Avakyan GG, Kutepova IS. 4-Benzoylpyridine oxime derivative (GIZH-298) versus valproic acid: the anticonvulsant potential effect in a model of epilepsy in rats with cobalt-induced lesions. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. [Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya]. 2017;9(2):57–66. (In Russ).]. DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.057-066
4. 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. – М.: Grif i K; 2013. (In Russ).].
5. 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 No. 85. (In Russ).].
6. 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.
7. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011, 23 p.
8. Сергиенко В.И. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение / под ред. В.И. Сергиенко, Р. Желлифф, И.Б. Бондарева // М.: Издательство РАМН. 2003. 208 с. [Sergienko VI. Prikladnaya farmakokinetika: osnovnye polozheniya i klinicheskoe primeneniye / Ed by. VI Sergienko, R Jelliff, IB Bondareva // Moscow: Izdatelstvo RAMN. 2003. (In Russ).].