

Булгакова Евгения Александровна

**РАЗРАБОТКА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ФАРМАКОКИНЕТИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ –
ПРОИЗВОДНОГО 3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-ОНА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент **Карпенко Юлия Николаевна**

Официальные оппоненты:

Куклин Владимир Николаевич - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии, профессор кафедры

Лукша Елена Александровна - кандидат фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической, аналитической и токсикологической химии, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Тюменский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Тюмень

Защита диссертации состоится «30» октября 2018 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В соответствии со Стратегией развития фармацевтической промышленности «ФАРМА-2020» актуальным является увеличение доли продукции отечественного производства на внутреннем рынке, разработка и производство инновационных лекарственных средств, импортозамещение и поддержка экспорта российских лекарств.

Одной из динамично развивающихся и востребованных групп лекарственных средств на сегодняшний день являются ноотропные препараты, используемые в различных областях медицинской практики. Сфера применения ноотропов не ограничивается различными формами нервной и психической патологии. Когнитивное, церебропротективное и стресс-защитное действие обуславливает также целесообразность их использования в фармакопрофилактике у здоровых лиц. В настоящее время продолжается поиск новых эффективных и безопасных соединений с ноотропной активностью, перспективными для изучения являются соединения из группы рацетамов, обладающие широким спектром фармакологической активности.

Синтезированное в Пермской государственной фармацевтической академии под руководством профессора Гейна В.Л. биологически активное соединение 4-(ацетил)-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он (КОН-1) показало более высокое антиамнестическое действие, чем пирацетам, и было рекомендовано для доклинических исследований в качестве потенциального ноотропного средства.

Одним из важных этапов доклинических исследований является изучение фармакокинетики нового биологически активного соединения, которое дает представление о процессах его всасывания, распределения, элиминации и позволяет обосновать выбор лекарственной формы, путей введения и схемы дозирования. В связи с этим возникает необходимость в разработке высокочувствительных аналитических методик, позволяющих достоверно определять концентрацию анализируемого вещества в условиях фармакокинетического эксперимента.

Степень разработанности темы исследования. Биологически активное соединение КОН-1 синтезировано впервые. Ранее были изучены биологическая активность (Шуклина Н.С., 2001), физико-химические свойства соединения, предложены методы контроля качества и стандартизации субстанции (Кляшева О.Н., 2014). Исследований по разработке методик определения КОН-1 в биологических объектах для целей изучения его фармакокинетики не проводилось.

Цель работы – разработка биоаналитических методик на основе современных физико-химических методов для исследования фармакокинетики биологически активного соединения КОН-1.

Задачи исследования:

- выбрать оптимальные условия определения КОН-1 методом обращённо-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в стандартных растворах и в извлечениях из биологических объектов;
- изучить процессы ионизации и характер фрагментации КОН-1 в условиях тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) и определить условия его детектирования в режиме регистрации ионных переходов (MRM);
- в условиях модельного эксперимента разработать методики изолирования КОН-1 из биологических жидкостей на основе прямого осаждения белков плазмы, жидкость-

жидкостной (ЖЖЭ) и твердофазной экстракции (ТФЭ), обеспечивающие максимальную эффективность извлечения;

- выбрать оптимальные условия изолирования КОН-1 из внутренних органов (печень) с учетом физико-химических свойств аналита;
- разработать и провести валидационную оценку методик количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ с различными способами детектирования, обосновать выбор внутреннего стандарта;
- разработать и провести валидационную оценку методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ;
- апробировать разработанные методики в фармакокинетическом эксперименте при пероральном введении субстанции КОН-1 кроликам и крысам.

Научная новизна. Впервые разработаны и валидированы методики количественного определения КОН-1 в извлечениях из биологических объектов на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием для целей изучения фармакокинетики нового биологически активного соединения.

Установлены оптимальные условия изолирования КОН-1 из водных растворов и биологических объектов (биоожидкостей и внутренних органов), обеспечивающие максимальную эффективность извлечения.

Впервые изучены процессы ионизации и характер фрагментации КОН-1 в условиях тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) и определены условия его детектирования в режиме регистрации ионных переходов (MRM).

Впервые рассчитаны основные фармакокинетические параметры КОН-1 после однократного перорального введения субстанции лабораторным животным.

Практическая значимость и внедрение результатов работы.

Разработанные методики определения КОН-1 в биологических объектах обладают специфичностью и высокой чувствительностью, что позволяет использовать их при изучении фармакокинетики соединения как на этапе доклинических, так и клинических исследований. Методика количественного определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с положительной оценкой апробирована в лаборатории физико-химических методов анализа ООО «Парма Клиникал», г. Пермь (Акт апробации от 19.12.2017 г.)

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России и используются при проведении практического занятия «Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС) в анализе лекарственных средств, доклинических фармакокинетических исследованиях новых биологически активных соединений, синтезированных в Пермской фармацевтической академии, и определении биоэквивалентности» цикла «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» для преподавателей кафедр фармацевтических вузов и училищ химического, технологического профиля, фармакогнозии и ботаники, проводимого на базе Регионального испытательного центра «Фарматест» и кафедры токсикологической химии ПГФА (Акт внедрения научных достижений в учебный процесс от 20.12.2017 г.)

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Материалы работы

используются в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий со студентами, обучающимися по специальности «Фармация» (Акт о внедрении результатов диссертационной работы от 29.05.2018 г.).

Методология и методы диссертационного исследования. Методология исследования включает анализ и обобщение отечественных и зарубежных литературных данных, оценку актуальности работы, постановку цели и задач, выполнение эксперимента по разработке и валидации методик определения КОН-1 в биологических объектах с использованием современных инструментальных физико-химических методов, статистическую оценку полученных результатов и апробацию в условиях фармакокинетического эксперимента.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы доложены на научно-практической конференции с международным участием «Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом» (Пермь, 2013), 5-ой Международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине» (Курск, 2013), Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне «Инновационные технологии в фармации» (Иркутск, 2015), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию Пермской государственной фармацевтической академии «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами» (Пермь, 2016), научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию ПГФА «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки» (Пермь, 2016), научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки» (Пермь, 2017).

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (6 глав), общих выводов, списка литературы, включающего 147 наименований (из них 85 источников зарубежной литературы), приложения. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, включает 35 таблиц, 46 рисунков и 7 страниц приложения.

Личный вклад автора. Результаты эксперимента, представленные в диссертации, получены автором лично либо при его непосредственном участии. Автором проведен весь спектр исследований, включая разработку методик, анализ и статистическую обработку полученных данных, подготовку материалов к публикации, написание диссертационной работы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе в изданиях Перечня ВАК – 3.

Связь темы диссертации с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации темы – 01.9.50 007417.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно п. 4 – разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических

исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований по выбору условий хроматографического определения КОН-1 методом обращённо-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием.
2. Результаты исследований по разработке методик изолирования КОН-1 из биологических жидкостей и тканей лабораторных животных.
3. Обоснование выбора внутреннего стандарта для количественного определения КОН-1 в биологических жидкостях.
4. Валидационная оценка разработанных биоаналитических методик.
5. Основные фармакокинетические параметры КОН-1, рассчитанные при пероральном введении субстанции лабораторным животным.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 представляет собой обзор литературных данных, в котором приведена характеристика современных ноотропных препаратов, их классификация с учетом механизма действия и химического строения. Показано, что рацетамы являются перспективной группой для поиска новых соединений, обладающих ноотропным действием. Дана характеристика биологически активного соединения КОН-1, синтезированного в Пермской государственной фармацевтической академии и рекомендованного для доклинических исследований в качестве потенциального ноотропного средства. Представлены обобщенные данные по фармакокинетике препаратов из группы рацетамов, описаны биоаналитические методики, используемые в фармакокинетических исследованиях ноотропов.

2 глава включает в себя описание объектов и методов, используемых при проведении экспериментальных исследований. Реактивы, растворители и методы, используемые при разработке методик и для проведения анализа, описаны в соответствующих фармакопейных статьях ГФ XIII, Том 1.

В **3 главе** приведены результаты эксперимента по выбору оптимальных условий определения КОН-1 методом обращено-фазной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором.

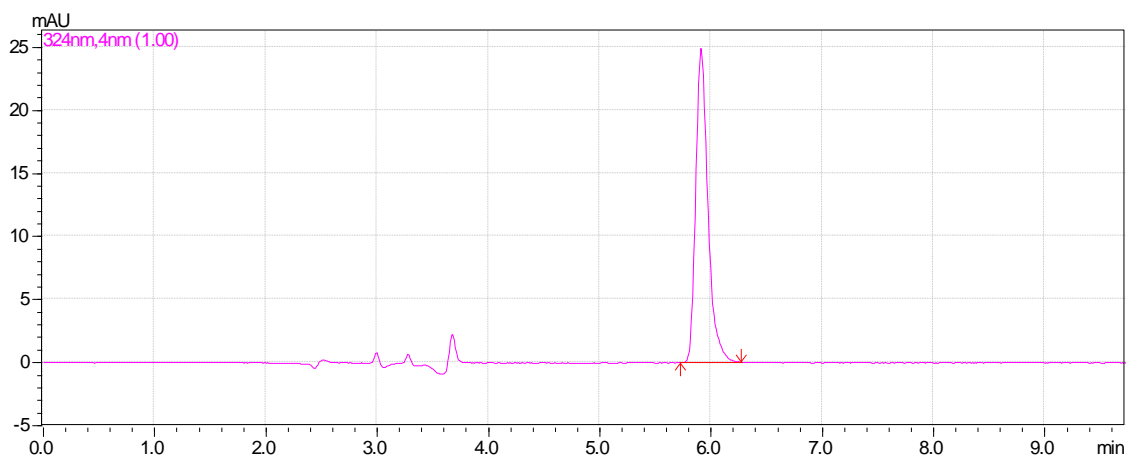
Установлено, что на характер поглощения исследуемого соединения при спектрофотометрическом детектировании оказывает влияние значение реакции среды подвижной фазы. УФ-спектр КОН-1, полученный при хроматографировании с использованием «кислых» элюентов (рН 2-3), имеет два максимума поглощения при 230 и 252 нм. При переходе на «нейтральные» подвижные фазы происходит смещение максимума поглощения КОН-1 к 324 нм. Этот факт обусловил выбор аналитических длин волн детектирования: 230 нм для работы с «кислыми» элюентами и 324 нм с «нейтральными».

При использовании элюентов на основе ацетонитрила и воды с содержанием органического растворителя более 30 % КОН-1 слабо удерживается обращено-фазным сорбентом и имеет время удерживания, близкое ко времени удерживания несорбируемого компонента. Уменьшение доли ацетонитрила в элюенте до 15 % приводит к появлению уширенного и асимметричного пика вещества. Неудовлетворительное удерживание КОН-1 на обращено-фазном сорбенте при использовании водно-ацетонитрильных элюентов потребовало введение в состав подвижной фазы модификаторов (кислот, солей).

При использовании «кислых» элюентов состава ацетонитрил – 0,1 % раствор кислоты трифторуксусной (ТФУК) и ацетонитрил – фосфатный буфер (рН3) оптимальных хроматографических характеристик КОН-1 удалось достигнуть при содержании ацетонитрила на уровне 40 %. Эффективность колонки при этом превышала 10 тысяч теоретических тарелок.

При использовании элюентов на основе ацетонитрила и фосфатного буфера с рН 7 во всех апробированных соотношениях компонентов КОН-1 элюировался в виде симметричных пиков. Коэффициент асимметрии пика находился в диапазоне 0,8-1,4. Эффективность хроматографической системы была максимальной при содержании ацетонитрила на уровне 20 – 25 % (14 000 – 16 000 ТТ).

Оптимальной подвижной фазой с точки зрения приемлемости хроматографических параметров (коэффициента емкости, селективности и эффективности разделения, симметрии пиков), экспрессности анализа, был выбран элюент: ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) с соотношением 25:75 (табл. 1, рис. 1).



**Рисунок 1 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)
Элюент: ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) 25:75**

В результате проведенных исследований предложены следующие условия хроматографического определения КОН-1 методом ВЭЖХ-УФ.

- хроматографическая колонка – «Luna 3uC18(2) 100A» (Phenomenex) (250 × 4,6 мм);
- подвижная фаза – ацетонитрил : фосфатный буфер (рН 7) 25:75;
- режим элюирования – изократический;
- скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- температура термостата колонки – 40°C;
- длина волны детектирования – 324 нм.

Анализ извлечений из интактных биологических жидкостей (плазмы крови и мочи) в данных условиях показал отсутствие на хроматограммах пиков эндогенных веществ, совпадающих со временем удерживания КОН-1, что свидетельствует о селективности предложенных условий.

**Таблица 1 - Параметры хроматографических пиков КОН-1 в исследованных подвижных фазах
(концентрация КОН-1 в стандартном растворе – 10 мкг/мл, объем вводимой пробы – 10 мкл,
скорость потока элюента – 1 мл/мин)**

Элюент	Соотношение компонентов	Время удерживания, мин	Фактор удерживания (k')	Площадь пика	Эффективность колонки (N), ТТ	Коэффициент асимметрии пика (Т)
Вода – ацетонитрил	50:50	2,11	0,57	168931	686	0,72
Вода – ацетонитрил	70:30	2,50	0,71	157471	595	0,81
Вода – ацетонитрил	85:15	6,21	1,59	127357	419	1,74
0,1 % раствор ТФУК – ацетонитрил	50:50	4,94	1,70	136311	7798	1,62
0,1 % раствор ТФУК – ацетонитрил	60:40	7,51	2,35	150452	10847	2,51
Фосфатный буфер (рН 3) – ацетонитрил	50:50	4,54	1,62	166579	7536	1,82
Фосфатный буфер (рН 3) – ацетонитрил	60:40	6,75	2,11	168548	10485	2,78
Фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил	60:40	2,10	0,51	169988	646	0,85
Фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил	70:30	4,26	1,42	196884	9892	1,24
Фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил	75:25	5,84	1,85	176920	14007	1,22
Фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил	80:20	10,81	2,70	177998	16709	1,36

Глава 4 включает в себя результаты экспериментальных исследований по разработке методик пробоподготовки биологических жидкостей к последующему аналитическому этапу на основе прямого осаждения белков плазмы крови, жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции, а также выбор условий изолирования КОН-1 из внутренних органов.

Прямое осаждение белков плазмы крови. При изучении условий изолирования КОН-1 из плазмы крови методом прямого осаждения белков в качестве осадителей были апробированы следующие денатурирующие агенты: ацетонитрил, метанол, 50 % раствор трихлоруксусной кислоты и 12 % раствор хлорной кислоты. Анализ полученных данных показал, что эффективность изолирования КОН-1 из модельных смесей плазмы при использовании растворов кислот находится на уровне 30-54 %, что свидетельствует о значительном соосаждении вещества с белками. Максимальное извлечение КОН-1 из плазмы обеспечило использование двойного объема метанола относительно плазмы (более 90 %), который и был выбран в качестве осадителя для дальнейших исследований (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность изолирования КОН-1 из модельных смесей плазмы крови методом осаждения белков

Осадитель	Соотношение <i>плазма крови / осадитель</i>	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, % (n = 6)
Ацетонитрил	1:1	2,11	$X_{cp.} = 79,48$ $SD = 1,12$ $RSD = 1,41$
	1:1	5,22	$X_{cp.} = 80,09$ $SD = 1,38$ $RSD = 1,73$
	1:1	10,44	$X_{cp.} = 81,47$ $SD = 1,87$ $RSD = 2,30$
Метанол	1:2	2,11	$X_{cp.} = 92,71$ $SD = 1,91$ $RSD = 2,06$
	1:2	5,22	$X_{cp.} = 94,16$ $SD = 1,72$ $RSD = 1,83$
	1:2	10,44	$X_{cp.} = 96,08$ $SD = 1,48$ $RSD = 1,54$
Раствор трихлоруксусной кислоты 50 %	2:1	2,11	$X_{cp.} = 30,00$ $SD = 0,95$ $RSD = 3,18$
	2:1	5,22	$X_{cp.} = 32,01$ $SD = 1,01$ $RSD = 3,18$
	2:1	10,44	$X_{cp.} = 32,19$ $SD = 1,72$ $RSD = 5,35$
Раствор хлорной кислоты 12 %	2:1	2,11	$X_{cp.} = 53,17$ $SD = 1,46$ $RSD = 2,75$
	2:1	5,22	$X_{cp.} = 53,43$ $SD = 1,33$ $RSD = 2,49$
	2:1	10,44	$X_{cp.} = 54,53$ $SD = 2,36$ $RSD = 4,32$

По результатам проведенного эксперимента предложена следующая методика пробоподготовки плазмы крови к хроматографическому исследованию на основе прямого осаждения белков:

к 250 мкл модельной смеси плазмы крови добавляют 500 мкл метанола, смесь встряхивают на лабораторном шейкере при 1500 об/мин в течение 5 минут и центрифугируют 5 минут при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм и исследуют методом ВЭЖХ.

Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ). С целью разработки методики изолирования КОН-1 из биологических жидкостей методом ЖЖЭ было предварительно изучено влияние рН среды, природы органического растворителя и кратности экстракции на степень извлечения вещества из стандартных водных растворов КОН-1. Для создания определенного значения рН среды использовались универсальные буферные смеси Бриттона-Робинсона со значениями рН в диапазоне от 2 до 11.

Полученные результаты показали, что максимальная степень извлечения КОН-1 из водных растворов (более 95 %) наблюдается при использовании хлороформа, а также смесей хлороформа и бутанола в соотношении 1:1 и 9:1 при рН 2-3 (рис. 2). Данные экстрагенты были использованы при разработке методик изолирования КОН-1 из плазмы крови и мочи.

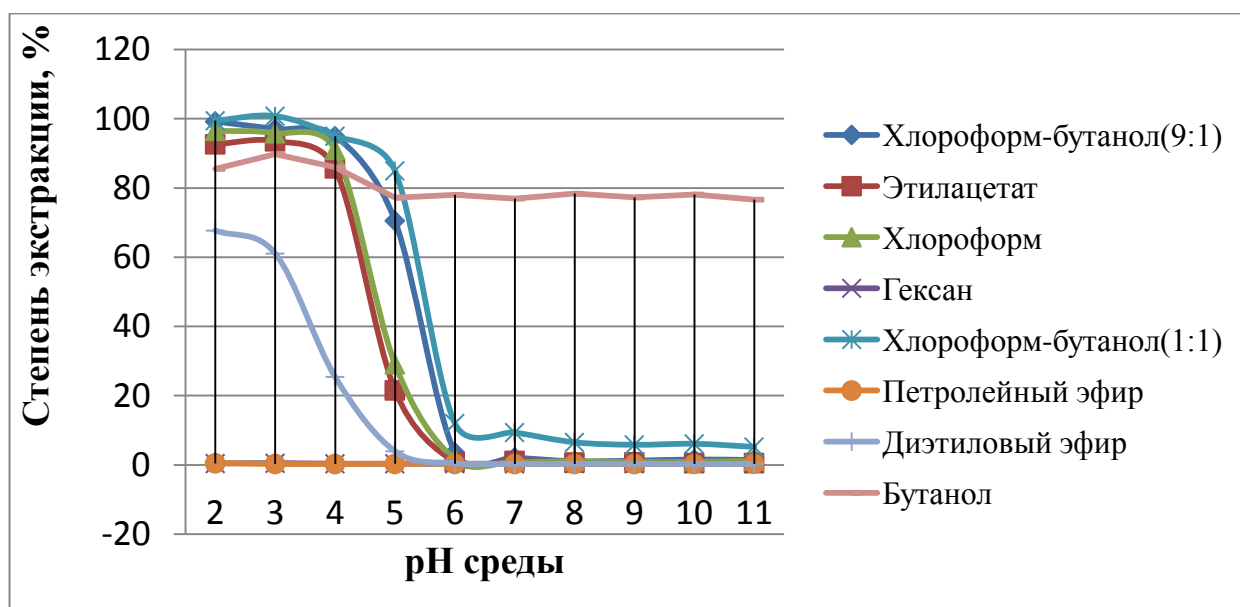


Рисунок 2 - Зависимость экстракции КОН-1 от рН среды водного раствора и природы экстрагента

Разработка методики изолирования КОН-1 из плазмы крови. Изучение экстракции КОН-1 из плазмы крови проводили на модельных смесях плазмы на трех уровнях концентраций с содержанием КОН-1 2, 5 и 10 мкг/мл.

В ходе эксперимента установлено, что максимальное извлечение КОН-1 достигается из разбавленных водой (1:1) образцов плазмы путем двукратной экстракции смесью хлороформ-бутанол (9:1) при рН 3 (табл. 3). Степень экстракции вещества составила 89-93 %.

Таким образом, были предложены условия пробоподготовки плазмы крови на основе жидкость-жидкостной экстракции:

1 мл разбавленной плазмы помещают в пробирку типа Эппендорф, добавляют 50 мкл хлористоводородной кислоты разведённой 8,3 % и 0,5 мл экстрагента. Пробирку встряхивают на лабораторном шейкере в течение 5 мин. Образовавшуюся эмульсию разрушают путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 5 мин. Органический слой переносят в выпарительную чашку. Экстракцию производят двукратно. Сухой остаток после удаления

экстрагента в токе теплого воздуха растворяют в 0,5 мл метанола. Извлечения фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр и исследуют методом ВЭЖХ.

Таблица 3 – Результаты двукратной экстракции КОН-1 из разбавленных водой модельных смесей плазмы крови

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, % (n=6)
хлороформ	2,01	$X_{cp.} = 68,83$ $SD = 2,42$ $RSD = 3,51$
	5,02	$X_{cp.} = 69,02$ $SD = 1,91$ $RSD = 2,76$
	10,04	$X_{cp.} = 70,86$ $SD = 1,69$ $RSD = 2,38$
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	$X_{cp.} = 90,90$ $SD = 2,02$ $RSD = 2,22$
	5,02	$X_{cp.} = 89,00$ $SD = 2,39$ $RSD = 2,69$
	10,04	$X_{cp.} = 93,05$ $SD = 1,94$ $RSD = 2,08$
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	$X_{cp.} = 72,46$ $SD = 2,32$ $RSD = 3,20$
	5,02	$X_{cp.} = 73,97$ $SD = 2,69$ $RSD = 3,64$
	10,04	$X_{cp.} = 75,08$ $SD = 1,59$ $RSD = 2,11$

Разработка методики изолирования КОН-1 из мочи. Для извлечения КОН-1 из модельных смесей мочи с концентрацией вещества 2, 5 и 10 мкг/мл были использованы хлороформ и смеси хлороформ-бутанол в соотношениях 1:1 и 9:1. Установлено, что наиболее эффективно анализируемое вещество извлекается из модельных смесей мочи двукратной экстракцией из кислой среды (рН 3) хлороформом. Степень извлечения КОН-1 в данных условиях составила более 97 % (табл. 4).

По результатам исследования предложена следующая методика пробоподготовки мочи методом ЖЖЭ:

1 мл мочи подкисляют 50 мкл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и проводят двукратную экстракцию хлороформом порциями по 0,5 мл (время каждой экстракции – 5 мин). Центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 минут, слой экстрагента отделяют, упаривают в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяют в 1 мл метанола. Извлечения фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр и исследуют методом ВЭЖХ.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). Разработку методики извлечения КОН-1 методом ТФЭ проводили на картриджах Strata C18-E (55 μ m, 70A) 200 mg/3ml (Phenomenex), упакованных гидрофобным сорбентом на основе силикагеля с привитой фазой C18. Выбор оптимальных условий осуществляли на стандартном водном растворе КОН-1 с концентрацией 5 мкг/мл.

В ходе разработки методики учитывались такие факторы, как условия промывки патрона при удалении соэкстрактивных веществ плазмы крови и состав элюента для экстракции целевого компонента.

Таблица 4 - Результаты двукратной экстракции КОН-1 из модельных смесей мочи

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, % (n=6)
хлороформ	2,01	$X_{cp.} = 97,44$ $SD = 2,06$ $RSD = 2,11$
	5,02	$X_{cp.} = 98,71$ $SD = 2,59$ $RSD = 2,63$
	10,04	$X_{cp.} = 98,01$ $SD = 2,63$ $RSD = 2,68$
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	$X_{cp.} = 92,30$ $SD = 1,81$ $RSD = 1,96$
	5,02	$X_{cp.} = 93,27$ $SD = 4,78$ $RSD = 5,13$
	10,04	$X_{cp.} = 92,55$ $SD = 4,85$ $RSD = 5,24$
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	$X_{cp.} = 89,41$ $SD = 2,55$ $RSD = 2,86$
	5,02	$X_{cp.} = 91,79$ $SD = 0,81$ $RSD = 0,88$
	10,04	$X_{cp.} = 90,96$ $SD = 2,33$ $RSD = 2,57$

При проведении пробоподготовки согласно стандартной инструкции было установлено, что значительная часть КОН-1 теряется на этапе промывки патрона 10 % раствором метанола и водой дистиллированной, а элюирующей силы используемых растворителей недостаточно для полного десорбирования аналита. Степень извлечения вещества не превышала 50 % при использовании на стадии элюирования метанола, и 6 % - ацетонитрила.

В ходе оптимизации методики нами были предложены следующие условия, обеспечившие увеличение степени экстракции исследуемого соединения из его водного раствора до 92 %, из модельной смеси плазмы крови (концентрация КОН-1 5 мкг/мл) - до 83 %:

- кондиционирование патрона 1 мл метанола и 1 мл воды дистиллированной;
- загрузка 1 мл модельной смеси (водного раствора или плазмы крови) со скоростью 1 мл/мин;
- промывка патрона 1 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты и 1 мл воды дистиллированной;
- элюирование аналита метанолом, подщелоченным аммиаком водным до pH 10.

Изолирование из внутренних органов. На первом этапе исследования нами были апробированы общие «классические» методы изолирования лекарственных средств, используемые в химико-токсикологическом анализе: изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой (метод Васильевой) и изолирование этанолом, подкисленным щавелевой кислотой (метод Стаса-Отто). Применение данных методов на модельных образцах печени (1 мг КОН-1 на 10 г биообъекта) показало низкую степень извлечения КОН-1: 15,44 % (метод Васильевой) и 0,19 % (метод Стаса-Отто). Использование «частного» метода Валоу, учитывающего кислотные свойства веществ и применяемого в химико-токсикологическом анализе при частном исследовании биообъектов на наличие барбитуратов, позволило увеличить степень извлечения КОН-1 до 32,68 %.

Нами была предложена методика изолирования КОН-1 из ткани печени с учетом физико-химических свойств вещества, основанная на настаивании биологического объекта с водой, подщелоченной аммиаком водным до рН 10, и последующей трехкратной экстракции аналита смесью хлороформ-бутанол (9:1) из кислой среды (рН 3). Использование разработанной методики позволяет извлекать 50,86 % КОН-1 в условиях модельного эксперимента.

В 5 главе приводятся результаты валидационной оценки методик количественного определения КОН-1 в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ. Валидацию разработанных методик проводили с использованием модельных смесей согласно современным требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Были оценены основные валидационные параметры: селективность, линейность, правильность и прецизионность.

Валидация методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ – УФ. Пробоподготовка мочи осуществлялась методом жидкость-жидкостной экстракции. Селективность методики была доказана анализом экстрактов из интактных образцов мочи. На «холостых» хроматограммах отсутствовали мешающие пики со временами удерживания, близкими ко времени удерживания КОН-1.

Линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций КОН-1 от 0,6 до 125 мкг/мл (рис.3). Коэффициент корреляции R^2 составил 0,99865. Предел обнаружения КОН-1 при использовании разработанной методики составил 0,2 мкг/мл, предел количественного определения (ПКО) – 0,6 мкг/мл. Относительная погрешность рассчитанной концентрации от фактической для точки на уровне ПКО не превышает 20 %, для остальных точек – 15 % (табл. 5).

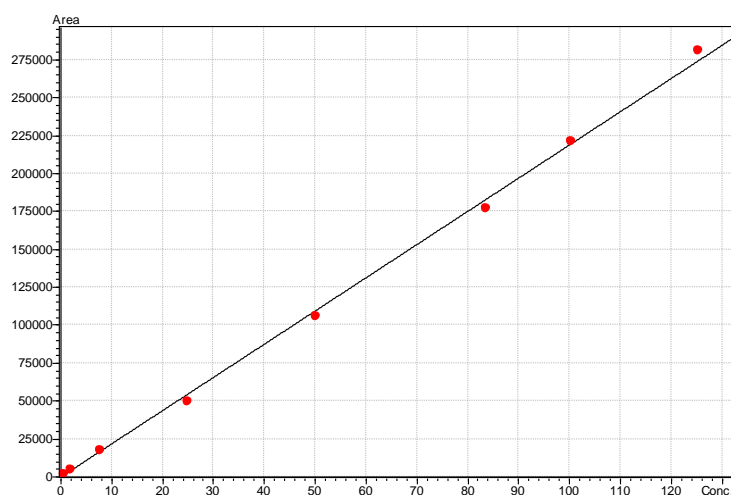


Рисунок 3 – Калибровочный график количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ

Таблица 5 - Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

$C_{\text{факт.}}$	0,69	2,09	7,79	25,1	50,2	83,3	100,4	125,5
$C_{\text{рассчит.}}$	0,63	2,15	7,84	22,97	48,23	81,46	100,86	128,84
$\delta, \%$	-8,7	2,87	0,64	-8,48	-3,92	-2,2	0,46	2,66
Норма	Не более 20 %		Не более 15 %					

Прецизионность и правильность методики оценивались на 5 уровнях концентраций (0,56; 3,36; 16,80; 62,75 и 111,56 мкг/мл), входящих в аналитический диапазон методики, по величинам относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной величины погрешности (δ ,%). Данные показатели не превышают 20 % для образца с концентрацией, соответствующей ПКО и 15 % для остальных образцов, что удовлетворяет критериям приемлемости (табл. 6).

Таблица 6 - Метрологические характеристики методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Найденная концентрация, мкг/мл $X_{\text{сред.}}(n = 6)$	SD	RSD,%	δ ,%
0,56	0,60	0,05	8,10	7,14
3,36	3,57	0,37	10,26	6,25
16,80	17,31	0,50	2,90	3,04
62,75	57,76	1,51	2,61	-7,95
111,56	102,76	3,76	3,65	-7,89

Разработка и валидация методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки использовался метод прямого осаждения белков плазмы метанолом, который отличается простотой и экспрессностью. В основу количественного определения КОН-1 в плазме крови был положен метод внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта выбрано близкое по химической структуре к КОН-1 соединение фенотропил (4-фенилпирацетам), которое в разработанных хроматографических условиях элюируется в виде симметричного пика со временем удерживания 7,5 минут (рис. 4), а также эффективно и воспроизводимо извлекается методом прямого осаждения белков плазмы крови (более 65 %).

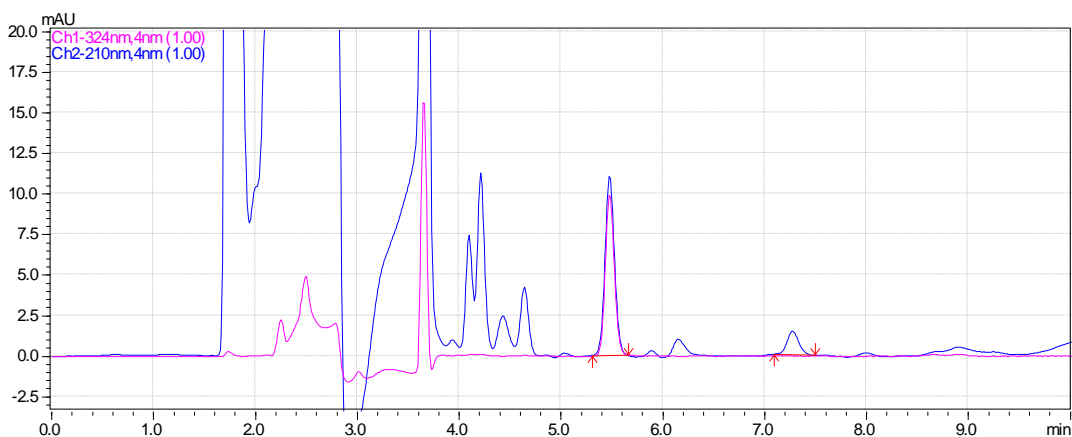


Рисунок 4 - Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы крови (концентрация КОН-1 5 мкг/мл)

Таким образом, нами предложена методика количественного определения КОН-1 в плазме крови с использованием внутреннего стандарта фенотропила:

250 мкл модельной смеси помещают в пробирку типа Эппендорф, добавляют 100 мкл раствора фенотропила (20 мкг/мл) и 500 мкл метанола. Пробирки встряхивают на лабораторном

шейкере при 1500 об/мин в течение 5 минут и центрифугируют 5 минут при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы с размером пор 0,45 мкм и исследуют методом ВЭЖХ.

Анализ хроматограмм экстрактов из холостых образцов плазмы крови человека и лабораторных животных (крыс, кроликов) показал отсутствие мешающих пиков эндогенных веществ на месте выхода КОН-1 и внутреннего стандарта, что свидетельствует о селективности методики.

Линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций КОН-1 от 36 до 9400 нг/мл (рис.5). Коэффициент корреляции R^2 составил 0,9993658. Предел обнаружения КОН-1 при использовании разработанной методики составил 20 нг/мл, предел количественного определения (ПКО) – 30 нг/мл. Относительная погрешность рассчитанной концентрации от фактической для точки на уровне ПКО не превышает 20 %, для остальных точек – 15 % (табл. 7).

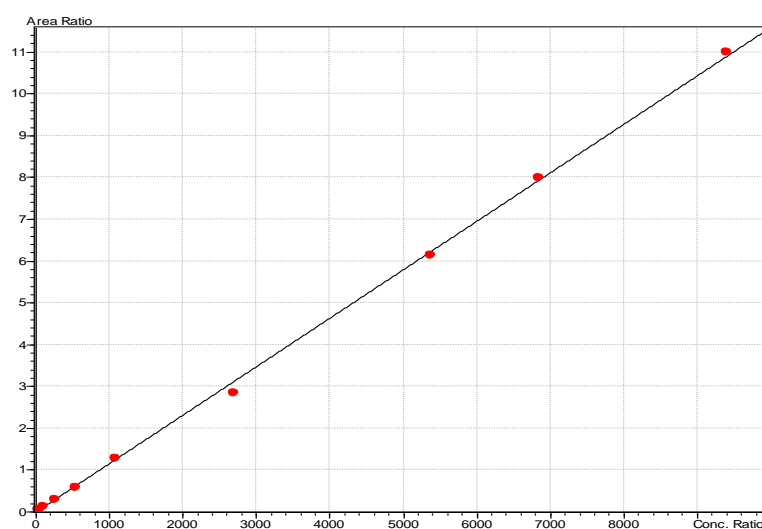


Рисунок 5 – Калибровочный график количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ

Таблица 7 – Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

$C_{\text{факт.}}$, нг	36	54	108	270	540	1080	2690	5380	6840	9400
$C_{\text{рассчит.}}$, нг	33	49	99	238	473	1070	2375	5125	6658	9163
ε , %	-8,3	-9,3	-8,3	-11,9	-12,4	-0,9	-11,7	-4,7	-2,7	-2,6
Норма	Не более 20%	Не более 15%								

Прецизионность и правильность методики оценивались на 6 уровнях концентраций (39, 120, 784, 1176, 4706, 7530 нг/мл), входящих в аналитический диапазон методики. Величины относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной величины погрешности (δ ,%) не превышают 20 % для образца с концентрацией, соответствующей ПКО и 15 % для остальных образцов, что удовлетворяет критериям приемлемости (табл. 8).

Таблица 8 - Оценка правильности и прецизионности методики определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, нг/мл	Найденная концентрация, нг/мл $X_{\text{сред.}} (n = 6)$	SD	RSD, %	$\delta, \%$
39	39,61	2,94	7,41	1,6
120	135,36	11,24	8,31	12,8
784	798,24	70,20	8,80	1,8
1176	1146,76	91,52	7,98	-2,5
4706	4399,71	162,14	3,69	-6,5
7530	7786,57	118,35	1,52	3,4

6 глава посвящена разработке методики определения КОН-1 в плазме крови методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) и ее валидационной оценке. Эксперимент проводился на жидкостном хроматографе «LCMS - 8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении).

В качестве элюентов были апробированы стандартные для ВЭЖХ-МС водно-ацетонитрильные и водно-метанольные смеси с добавлением муравьиной кислоты или ацетатного буферного раствора. В случае использования кислых элюентов в различных соотношениях форма хроматографического пика КОН-1 была неудовлетворительной и характеризовалась сильно затянутым задним фронтом. Элюенты на основе метанола плохо элюировали аналит из хроматографической колонки.

Оптимальной формы пика исследуемого соединения удалось достигнуть, используя водно-ацетонитрильный элюент и градиентный режим элюирования. Время удерживания КОН-1 в данных условиях составило 5,7 минут (рис. 6).

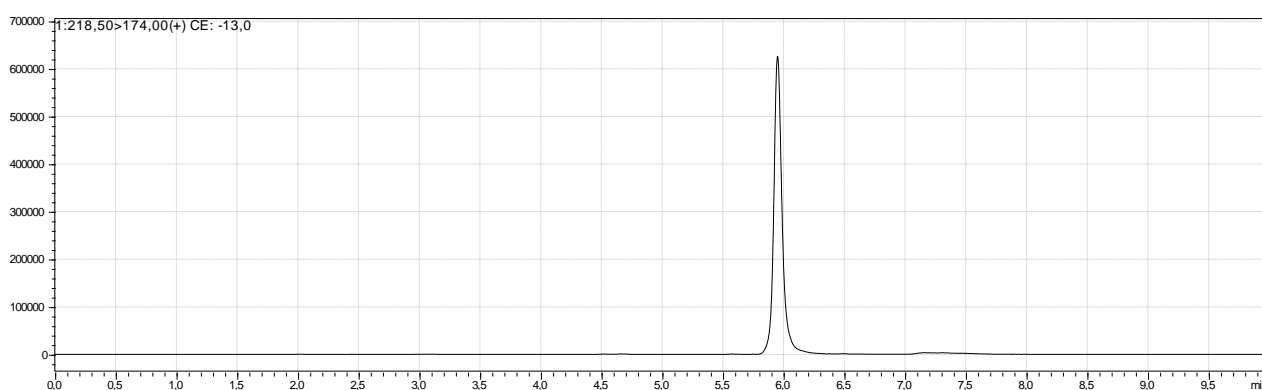


Рисунок 6 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) с использованием подвижной фазы вода – ацетонитрил (градиентное элюирование с 20 до 50 % ацетонитрила за 7 минут)

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования КОН-1. Масс-спектр первого порядка КОН-1, полученный в режиме регистрации положительно заряженных ионов, содержит интенсивный ион протонированной молекулы с m/z 354 (рис. 7).

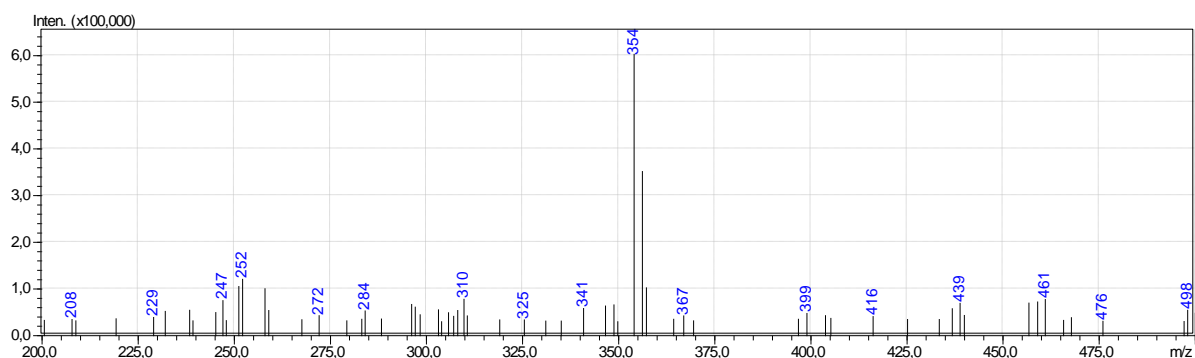


Рисунок 7 - Масс-спектр КОИ-1 первого порядка, снятый в режиме положительной ионизации

На этапе выбора подходящих ионных переходов (режим MRM) было установлено, что наиболее интенсивными ионами, полученными при фрагментации материнского иона (m/z 354), оказались ионы с массовыми числами 209 и 181, обнаруженные при сканировании на третьем квадруполе масс-анализатора (рис. 8). Энергия соударений (CE) для данных переходов составила -28 эВ и -39 эВ, соответственно. Переход $354 \rightarrow 209$, показавший наибольшую чувствительность, был выбран для количественного определения КОИ-1.

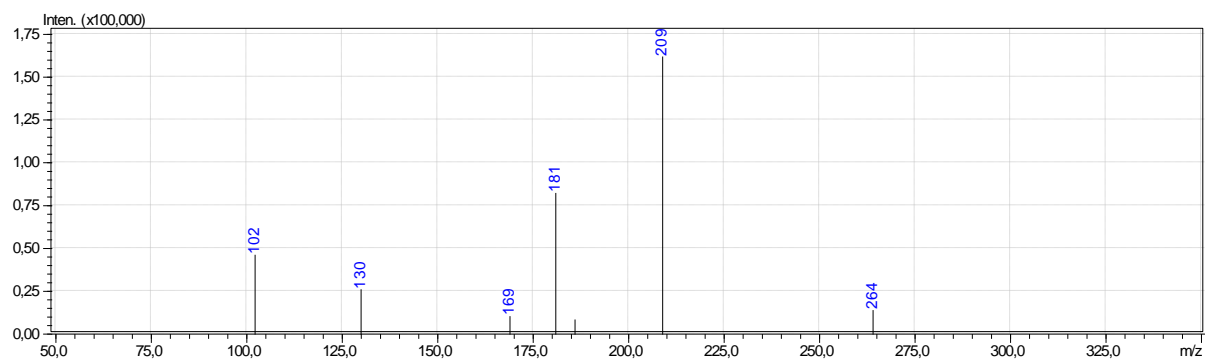


Рисунок 8 – Масс-спектр фрагментных ионов КОИ-1

При выборе оптимальных условий пробоподготовки плазмы к хроматомасс-спектрометрическому определению КОИ-1 были апробированы разработанные варианты прямого осаждения белков плазмы и жидкость-жидкостной экстракции. Извлечения, полученные прямым осаждением белков, оказались наименее пригодными из-за высокого влияния «матричного» эффекта, обусловленного эндогенными компонентами биологической матрицы вследствие недостаточной очистки. При анализе данных образцов наблюдали резкое снижение отклика масс-спектрометрического детектора по отношению к определяемому веществу и высокий фон от эндогенных веществ, что в результате негативным образом влияло на чувствительность определения.

«Матричный эффект» при анализе извлечений из плазмы, полученных путем жидкость-жидкостной экстракции, был значительно ниже, что свидетельствует о лучшей очистке от эндогенных соединений. Поэтому данный вариант пробоподготовки был использован нами для разработки методики количественного определения КОИ-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

В качестве внутреннего стандарта для количественного определения КОИ-1 использован фенотропил, который эффективно извлекается из «кислой» среды смесью хлороформ-бутанол (9:1) (степень извлечения - 78,33 %).

Поскольку в литературе отсутствует информация об определении фенотропила методом ВЭЖХ-МС/МС, нами были получены масс-спектры фенотропила первого и второго порядка в

режиме положительной ионизации при использовании подвижной фазы ацетонитрил: вода и выбран оптимальный ионный переход в режиме MRM для детектирования: 218 → 174 (рис. 9). Оптимизированная энергия соударений (CE) для данного перехода составила – 13 эВ.

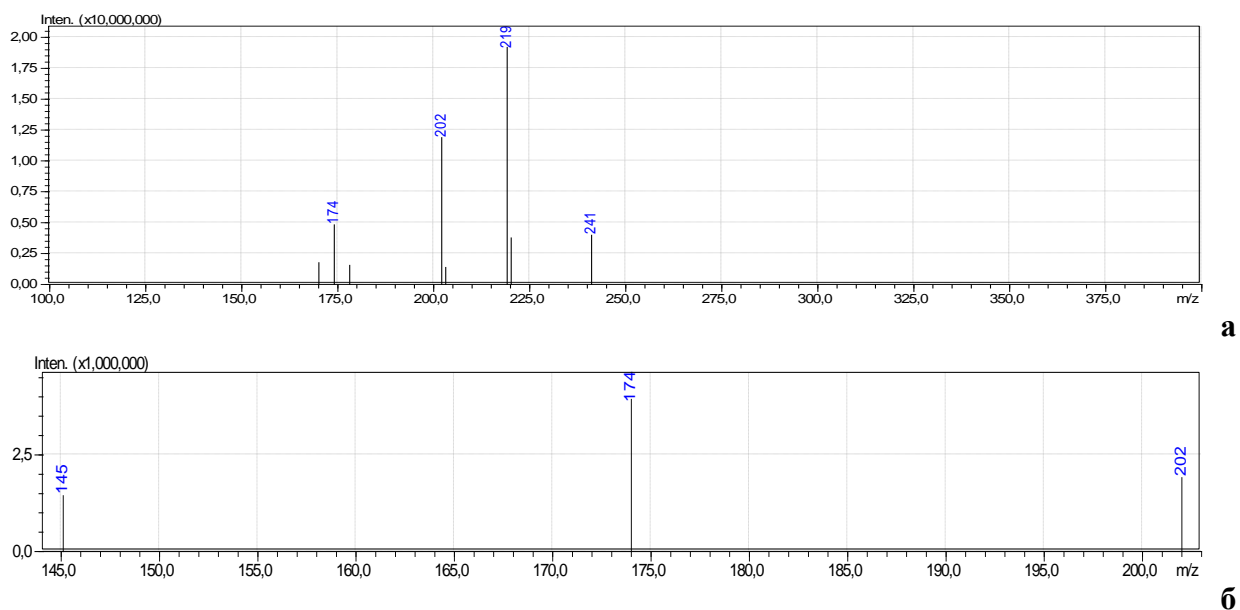


Рисунок 9 – Масс-спектр фенотропила 1 порядка (а) и спектр фрагментных ионов (б)

По результатам проведенных исследований нами разработана следующая методика количественного определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС:

0,5 мл плазмы крови помещают в пробирку типа Эппендорф, добавляют 0,5 мл воды, 100 мкл раствора внутреннего стандарта фенотропила с концентрацией (100 мкг/мл), 50 мкл раствора кислоты хлороводородной разведенной 8,3 % и 0,5 мл экстрагента (хлороформ-бутанол 9:1). Пробирку встряхивают на лабораторном шейкере в течение 2 мин. Образовавшуюся эмульсию разрушают путем центрифугирования при 13000 об/мин в течение 5 мин. Органический слой переносят в хроматографическую виалу, сухой остаток после удаления экстрагента в токе теплого воздуха растворяют в 0,5 мл метанола. 1 мкл раствора вводят в инжектор хроматографа. Хроматографическое исследование проводят в режиме градиента в элюенте ацетонитрил – вода. Детектирование образующихся ионов осуществляют в режиме MRM, используя ионные переходы 354 → 209 (для КОН-1) и 218 → 174 (для фенотропила). Пример хроматограммы экстракта из модельной смеси плазмы с концентрацией КОН-1 500 нг/мл представлен на рис. 10.

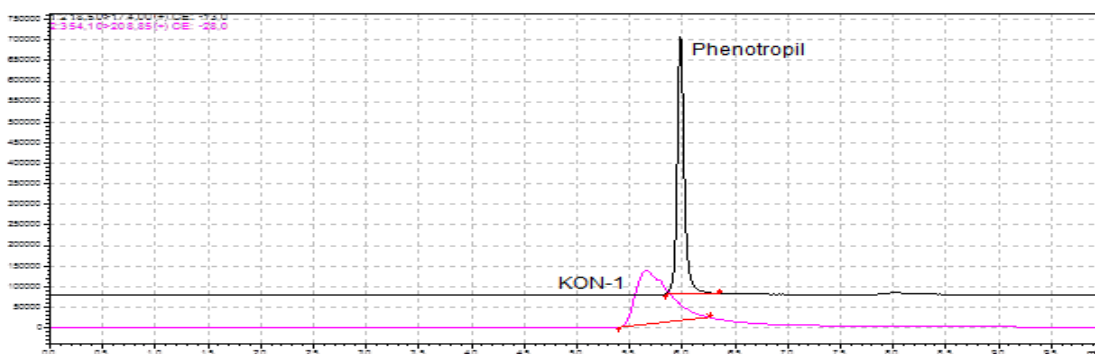


Рисунок 10 - Хроматограмма извлечения из модельного образца плазмы

На хроматограммах экстрактов интактной плазмы отсутствовали пики, совпадающие по времени удерживания с пиками анализируемого вещества и внутреннего стандарта, что свидетельствует о *селективности* методики.

Линейность методики была подтверждена в диапазоне от 43 до 9200 нг/мл (рис.11). Коэффициент корреляции R^2 составил 0,9986041. *Предел обнаружения* КОН-1 при использовании разработанной методики составил 10 нг/мл, *предел количественного определения* (ПКО) – 40 нг/мл. Относительная погрешность рассчитанной концентрации от фактической для образца, соответствующего ПКО, не превышает 20 %, для остальных точек – 15 % (табл. 9).

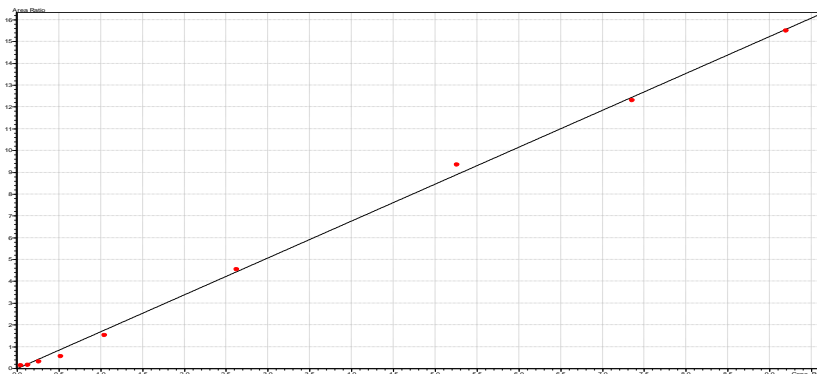


Рисунок 11 - Калибровочный график количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Таблица 9 – Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

$C_{\text{факт.}}$, нг	43	130	260	530	1050	2630	5260	7360	9200
$C_{\text{рассчит.}}$, нг	48	119	237	490	995	2687	5515	7262	9148
$\delta, \%$	11,6	-8,5	-8,8	-7,5	-5,2	2,2	4,8	-1,3	-6,7
Норма	Не более 20 %	Не более 15 %							

Прецизионность и правильность методики оценивались на 5 уровнях концентраций (36; 110; 530; 1230; 3680; 6690 нг/мл). Полученные значения относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной величины погрешности ($\delta, \%$) свидетельствует о приемлемой прецизионности и правильности методики (табл. 10).

Таблица 10 – Оценка правильности и прецизионности методики определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, нг/мл	Найденная концентрация, нг/мл $X_{\text{сред.}}$, (n = 6)	SD	RSD, %	$\delta, \%$
36	38	3,16	8,32	5,5
110	102	11,08	10,86	-7,3
530	529	67,48	12,76	-1,2
1230	1192	92,62	7,77	-3,1
3680	3509	337,13	9,61	- 4,8
6690	6663	714,91	10,73	- 0,4

В 7 главе представлены результаты фармакокинетического эксперимента после перорального введения субстанции КОН-1 кроликам и крысам. Была исследована экскреция КОН-1 из организма крыс через 24, 48 и 72 часа после однократного перорального введения субстанции в дозе 100 мг/кг. Установлено, что за 24 часа в среднем из организма крыс выводится 4,57 % неизмененного КОН-1 относительно введенной дозы. За вторые сутки выводится 0,72 % вещества. При анализе образцов мочи, полученных за третьи сутки после введения, КОН-1 обнаруживался в следовых количествах (табл. 11).

Таблица 11 – Усредненные данные по результатам изучения экскреции КОН-1 из организма крыс с мочой

Период времени сбора мочи, ч	0 – 24	24 – 48	48 – 72	0 – 72
% от введенной дозы, $X_{\text{сред.}} \pm SD$ (n = 6)	4,57 ± 0,97	0,72 ± 0,32	0,01 ± 0,02	5,30 ± 1,16

Данные о динамике изменения концентраций КОН-1 в плазме кроликов во времени после однократного введения субстанции в дозе 100 мг/кг представлены на рисунке 12.

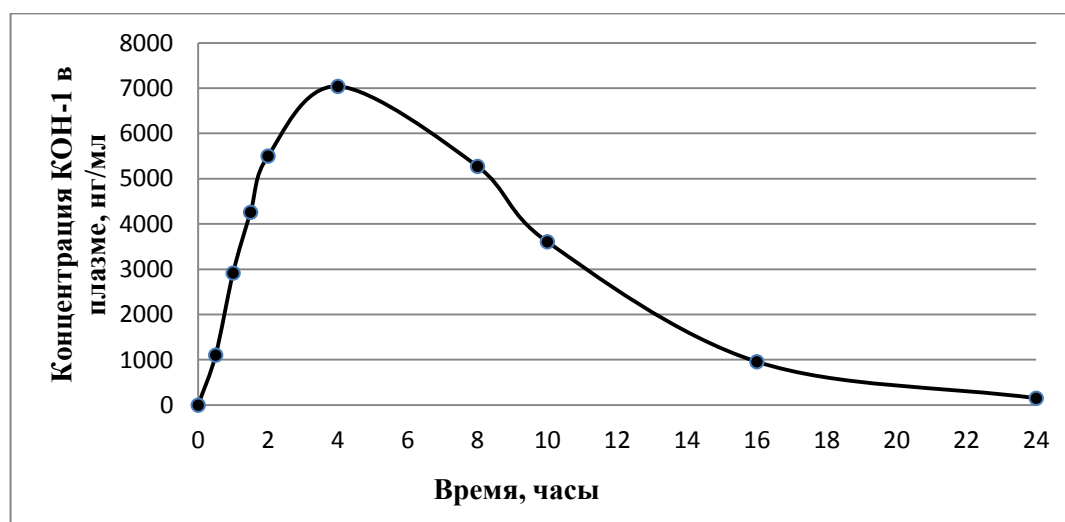


Рисунок 12 - Динамика изменения концентрации КОН-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения

Таблица 12 - Фармакокинетические параметры КОН-1 после однократного перорального введения кроликам в дозе 100 мг/кг

№ животного	$AUC_{0 \rightarrow t}$, нг/мл×ч	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг/мл×ч	T_{max} , ч	C_{max} , нг/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, ч	MRT, ч	$C_{\text{max}} / AUC_{0 \rightarrow t}$
1	86059	86760	4,0	8960	0,26	2,67	6,72	0,10
2	51524	52518	4,0	4912	0,18	3,85	6,24	0,10
3	128717	129370	4,0	10785	0,26	2,67	7,19	0,08
4	70975	71969	2,0	7648	0,18	3,85	6,21	0,11
5	76919	78061	2,0	6003	0,20	3,47	6,78	0,08
6	53115	53716	4,0	4930	0,21	3,30	6,45	0,09
$\bar{X} \pm SD$	77885 ± 28312	78732 ± 28241	3,33 ± 1,03	7206 ± 2365	0,22 ± 0,04	3,30 ± 0,53	6,60 ± 0,37	0,09 ± 0,01

На основе полученных данных были рассчитаны основные фармакокинетические параметры КОН-1 (табл. 12). Установлено, что КОН-1 хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, максимальная концентрация вещества в плазме крови кроликов достигается через 3,3 часа и в среднем составляет 7206 нг/мл.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные условия анализа КОН-1 методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Установлено, что хроматографирование в системе ацетонитрил – фосфатный буфер (рН7) (25:75) с использованием длины волны детектирования 324 нм обеспечивает высокую чувствительность и специфичность определения КОН-1 в извлечениях из биологических объектов.
2. При выборе условий анализа КОН-1 методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии изучены процессы ионизации и характер фрагментации КОН-1 и определен канал его детектирования в режиме регистрации ионных переходов (354 → 209).
3. Предложены различные варианты пробоподготовки плазмы крови на основе прямого осаждения белков, жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции в соответствие с последующим аналитическим этапом. Обоснована необходимость разных способов пробоподготовки плазмы крови при использовании спектрофотометрической и масс-спектрометрической детекции.
4. Разработана методика изолирования КОН-1 из ткани печени водой, подщелоченной раствором аммония гидроксида, с последующей экстракцией аналита смесью хлороформ – бутанол (9:1) при рН 3.
5. Разработаны высокочувствительные методики определения КОН-1 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве внутреннего стандарта для расчета количественного содержания КОН-1 в извлечениях рекомендован фенотропил, который эффективно извлекается из биожидкости и определяется в предложенных для КОН-1 хроматографических условиях. Проведенная валидационная оценка разработанных методик доказала их селективность, линейность, правильность и прецизионность.
6. Разработана и валидирована методика количественного определения КОН-1 в моче, основанная на извлечении вещества жидкость-жидкостной экстракцией и последующем анализе методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием.
7. С помощью разработанных методик рассчитаны основные фармакокинетические параметры КОН-1 при пероральном введении субстанции КОН-1 кроликам и крысам. Установлено, что методики обладают специфичностью и высокой чувствительностью, что позволяет их использовать при изучении фармакокинетики соединения как на этапе доклинических, так и клинических исследований.

Основные положения диссертационной работы опубликованы:

1. Булгакова, Е.А. Экстракция биологически активного соединения КОН-1 из водных растворов / **Е.А. Булгакова**, Ю.Н. Карпенко, Е.Ю. Тумилович // Мат. 5-ой Международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине» – Курск, 2013. - С. 38-40.

2. **Булгакова, Е.А.** Выбор оптимальных условий извлечения биологически активных производных 3-пирролин-2-она из мочи / Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко // *Инновационная наука: международный научный журнал*. – 2015. - № 4/2015, ч. 3. – С. 135-137.
3. **Булгакова, Е.А.** Разработка методики изолирования биологически активного производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она из плазмы крови методом жидкость-жидкостной экстракции / Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко // *«Инновационные технологии в фармации»*. Мат. Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. – Иркутск, 2015. – С. 96-98.
4. Твердофазная экстракция в анализе биологически активного производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она / **Е.А. Булгакова**, Ю.Н. Карпенко, Т.И. Ярыгина, А.И. Возмищева, Е.А. Сырыгина // *«Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами»*. Мат. II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию Пермской государственной фармацевтической академии (12-14 мая 2016 года). – Пермь, 2016. – С. 51-54.
5. **Булгакова, Е.А.** Выбор способа пробоподготовки плазмы крови для хроматографического определения биологически активного соединения КОН-1 / Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И. // *«Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки»*. Мат. научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию ПГФА. – Пермь, 2016. - № 18. – С. 54-57.
6. **Булгакова, Е.А.** Разработка методики количественного определения биологически активного соединения, производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она, в плазме крови методом тандемной хроматомасс-спектрометрии / Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко, Т.И. Ярыгина // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2017. - № 2. – С. 106-111.
7. **Булгакова, Е.А.** Определение производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она в моче и изучение его экскреции из организма лабораторных животных / Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко, Т.И. Ярыгина // *Фармация и фармакология*. – 2017. - Т. 5, № 4. – С. 331-343. DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-4-331-343.
8. Разработка методики изолирования биологически активного соединения КОН-1 из внутренних органов / **Булгакова Е.А.**, Карпенко Ю.Н., Бирюкова В.В., Гребнев И.А. // *«Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки»*. Мат. научно-практической конференции с международным участием (7 декабря 2017 года). – Пермь, 2017. – № 20. – С. 85-88.
9. **Булгакова, Е.А.** Определение биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с минимальной пробоподготовкой: разработка и валидация методики, использование в доклинических фармакокинетических исследованиях / Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко // *Сеченовский вестник*. – 2018. - № 1(31). – С. 60-65.

Булгакова Евгения Александровна (Россия)

Разработка биоаналитических методик для исследования фармакокинетики биологически активного соединения – производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она

Разработаны методики количественного определения КОН-1 в извлечениях из биологических объектов (плазма крови, моча, ткань печени) на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием для целей изучения фармакокинетики нового биологически активного соединения. Валидационная оценка методик подтвердила их специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

С помощью разработанных методик рассчитаны основные фармакокинетические параметры КОН-1 при пероральном введении субстанции кроликам и крысам.

Bulgakova Evgenia Alexandrovna (Russia)

Development of bioanalytical methods for the study of pharmacokinetics a biologically active compound - a derivative of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-one

Methods for the quantitative determination of KON-1 in extracts from biological objects (blood plasma, urine, liver tissue) based on the method of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and mass-spectrometric detection for the purpose of studying the pharmacokinetics of a new biologically active compound were developed and validated. The validation of the methods confirmed their selectivity, linearity, accuracy and precision.

Using the developed methods the main pharmacokinetic parameters of KON-1 for oral administration of the substance to rabbits and rats were determined.