

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
кандидат фармацевтических наук,  
доцент Карпенко Ю.Н.

Пермь – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Характеристика ноотропных средств.....	12
1.2. Фармакокинетика ноотропов из группы рацетамов.....	17
1.3. Характеристика биологически активного соединения КОН-1.....	22
1.4. Особенности биоаналитического этапа исследований фармакокинетики ноотропов.....	24
1.4.1. Пробоподготовка биологических объектов .....	24
1.4.2. Аналитические методы в фармакокинетических исследованиях ноотропов.....	30
1.4.3. Валидация биоаналитических методик.....	31
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....	34
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Объекты исследования.....	35
2.2. Реактивы и растворители.....	43
2.3. Оборудование.....	45
2.4. Методы исследования.....	46
ГЛАВА 3. ВЫБОР УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОН-1 МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ.....	48
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	56
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КОН-1.....	57
4.1. Изучение условий изолирования КОН-1 из плазмы крови методом прямого осаждения.....	57
4.2. Использование метода жидкость-жидкостной экстракции для изолирования КОН-1 из биологических жидкостей.....	61
4.2.1. Изучение процесса экстракции КОН-1 из водных растворов.....	61

4.2.2. Разработка методики изолирования КОН-1 из плазмы крови.....	65
4.2.3. Разработка методики изолирования КОН-1 из мочи .....	71
4.3. Изучение условий изолирования КОН-1 из плазмы крови методом твердофазной экстракции (ТФЭ).....	76
4.4. Изучение условий изолирования КОН-1 из внутренних органов.....	81
4.4.1. Апробация общих и частных методов изолирования для извлечения КОН-1.....	81
4.4.2. Оптимизация методики извлечения КОН-1 из биообъектов.....	85
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4.....	90
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОН-1 В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ВЭЖХ – УФ.....	93
5.1. Валидация методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ – УФ.....	93
5.2. Разработка и валидация методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ.....	100
5.2.1. Обоснование выбора внутреннего стандарта.....	100
5.2.2. Валидация методики.....	103
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....	111
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОН-1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ВЭЖХ – МС/МС).....	113
6.1. Изучение условий хроматографического разделения КОН-1 на стандартных растворах.....	113
6.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования КОН-1.....	117
6.3. Разработка методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.....	119
6.4. Валидация методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.....	122
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.....	128
ГЛАВА 7. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОН-1.....	130
7.1. Изучение экскреции КОН-1 из организма крыс.....	130
7.2. Изучение фармакокинетики КОН-1 на кроликах.....	133
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 7.....	136

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	155

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

УФ – Ультрафиолетовый свет

ВЭЖХ-МС/МС – Высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

MRM – Multiple Reaction Monitoring (мониторинг множественных реакций)

SIM – Selected Ion Monitoring (мониторинг выбранных ионов)

ESI – Electrospray Ionization (ионизация электроспреем)

APCI – Chemical Ionization at Atmospheric Pressure (химическая ионизация при атмосферном давлении)

ПФ – Подвижная фаза

НФ – Неподвижная фаза

ТФЭ – Твердофазная экстракция

ЖЖЭ – Жидкость-жидкостная экстракция

ГАМК – Гамма-аминомасляная кислота

АКТГ – Адренкортикотропный гормон

ЦНС – Центральная нервная система

ЖКТ – Желудочно-кишечный тракт

ФСП – Фармакопейная статья предприятия

FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

EMA – European Medicines Agency (Европейское агентство лекарственных средств)

## ВВЕДЕНИЕ

**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 целесообразность их использования и 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 [8, 12].

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 [15, 16, 61].

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 (биожидкостей 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), Всероссийской научно-методической 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 (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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Характеристика ноотропных средств

Ноотропная концепция начала формироваться в начале 70-х годов, когда впервые бельгийской фармацевтической компанией UCB Pharma был синтезирован пирацетам [12, 41].

Термин «ноотропный препарат» (от греч. *noos* — мышление, разум; *tropos* — стремление) был предложен Corneliu E. Giurgea для обозначения средств, оказывающих специфическое активизирующее влияние на интегративные функции мозга, стимулирующих обучение, память и умственную деятельность, повышающих устойчивость мозга к повреждающим факторам, улучшающих кортико-субкортикальные связи [33, 35, 41, 54, 60].

Классификация ноотропных препаратов основана на представлении о механизмах действия веществ, с учетом их химического строения [3, 4, 10, 12, 52, 58]. Существующие ноотропы могут быть классифицированы следующим образом:

#### 1. Препараты, стимулирующие метаболические процессы в нервных клетках:

- производные пирролидона: пирацетам, фенотропил, оксирацетам, анирацетам, прамирацетам, этирацетам, фенилпирацетам и др. [6, 12, 19, 81, 99, 106];
- производные гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК): аминалон, пикамилон, гаммалон, фенибут, ноофен;
- гопантенная кислота и ее производные: пантогам, гопантам, пантокальцин, кальция гопантенат [12, 58];
- производные диметиламиноэтанола: меклофеноксат, нооклерин и др.;
- препараты, содержащие нейроаминокислоты и пептиды: глицин, церебролизин, кортексин, актовегин, ноопепт [7, 36, 58];
- антигипоксанты: мексидол, мексикор, мексиприм, церекард и др. [58, 60];

- производные витамина В6 – пиридоксина: пиритинол, пиридитол, энэрбол, энцефабол [31, 58, 94].

2. Препараты, оказывающие положительное воздействие на сосуды, или вазотропные препараты:

- церебральные вазодилататоры: ксантинола никотинат, винкамин, ницерголин, винпоцетин, кавинтон и др. [127, 139];
- ангиопротекторы: пентоксифиллин, трентал;
- антагонисты кальция: нимодипин, циннаризин и др.;
- растительные препараты: билобил, танакан, гинкоум, мемоплант (содержат гинкго двулопастного листьев экстракт) [58].

3. Препараты, стимулирующие процессы памяти и обучения:

- холиномиметики и антихолинэстеразные: галантамин, холин, амиридин и др. [12, 141];
- вещества, влияющие на аденозиновую систему: кофеин, пропентофиллин, ролипрам и др. [12, 63]
- гормоны: кортикотропин, вазопрессин, адренкортикотропный гормон, семакс (аналог АКТГ) [10, 60];
- эндорфины, энкефалины.

4. Комбинированные препараты:

- фезам (пирацетам, циннаризин);
- винпотропил (пирацетам, винпоцетин);
- ороцетам (пирацетам, оротовая кислота);
- тиоцетам (пирацетам, тиотриазолин);
- диапирам (пирацетам, диазепам);
- цитофлавин (янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, рибофлавин-монопнуклеотид);

- инстенон (гексобендин, этамиван, этофиллин) и др. [6, 31, 53, 58]

Согласно международной классификации болезней МКБ-10 ноотропные препараты применяют при болезнях, относящихся к V классу «Психические расстройства и расстройства поведения» [12]. В основе терапевтического действия ноотропных препаратов лежит несколько механизмов действия, основным из которых является влияние на биохимические процессы, отвечающие за реализацию интеллектуально – мнестических функций (познавательные процессы, обучение, память) [1, 9, 11, 47, 52, 53]. Кроме того, они оказывают адаптогенный, антиастенический, психостимулирующий, седативный и другие виды эффектов [3, 31, 52, 69].

На мировом рынке среди ноотропных препаратов преобладает группа рацетамов, производных альфа-пирролидона, обладающая широким спектром фармакологической активности.

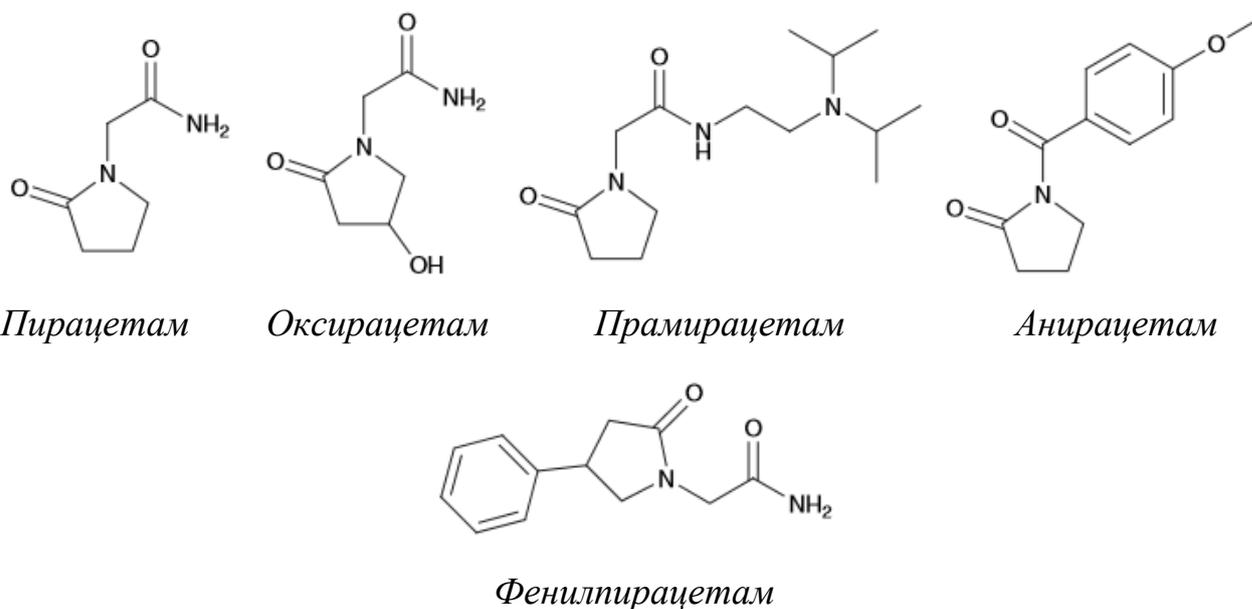
Данные соединения используются при лечении заболеваний ЦНС, связанных с нарушением познания и памяти, при нейродегенеративных заболеваниях, инсультах, ишемической болезни, стрессах тревожных состояниях, а также эпилепсии.

В настоящее время существует более 10 «пирацетамоподобных» лекарственных средств (8 из которых прошли клинические испытания по различным показаниям со стороны ЦНС), которые можно разделить на 3 группы (приложение 1, рисунки 1.1-1.3) [41, 49, 103].

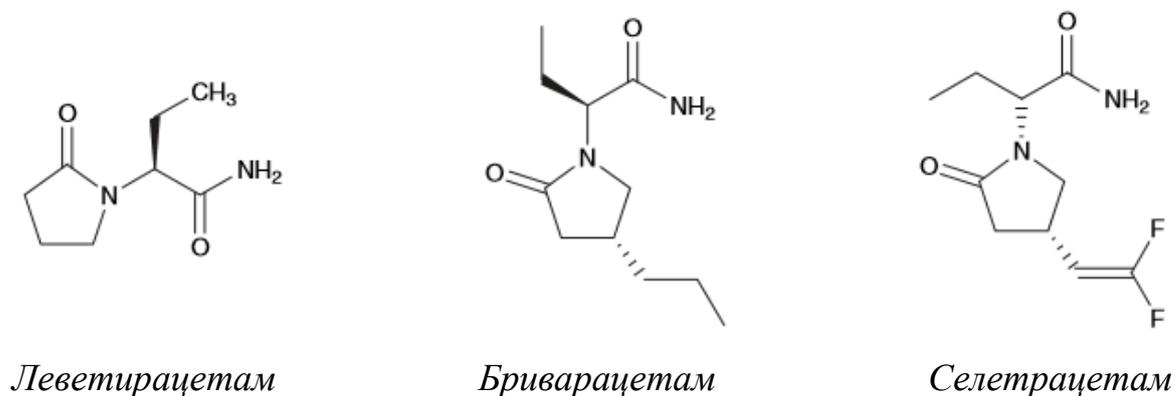
1. Пирацетам, оксирацетам, анирацетам, прамирацетам и фенилпирацетам. Это препараты, преимущественно используемые для лечения когнитивных нарушений. Оксирацетам и анирацетам в клинической практике более не используются. Препараты данной группы также могут применяться при нарушениях равновесия, кортикальной миоклонии и дислексии.

2. Леветирацетам, бриварацетам и селетрацетам. Препараты этой группы проявляют антиэпилептическую активность, их влияние на когнитивные процессы неизвестно.

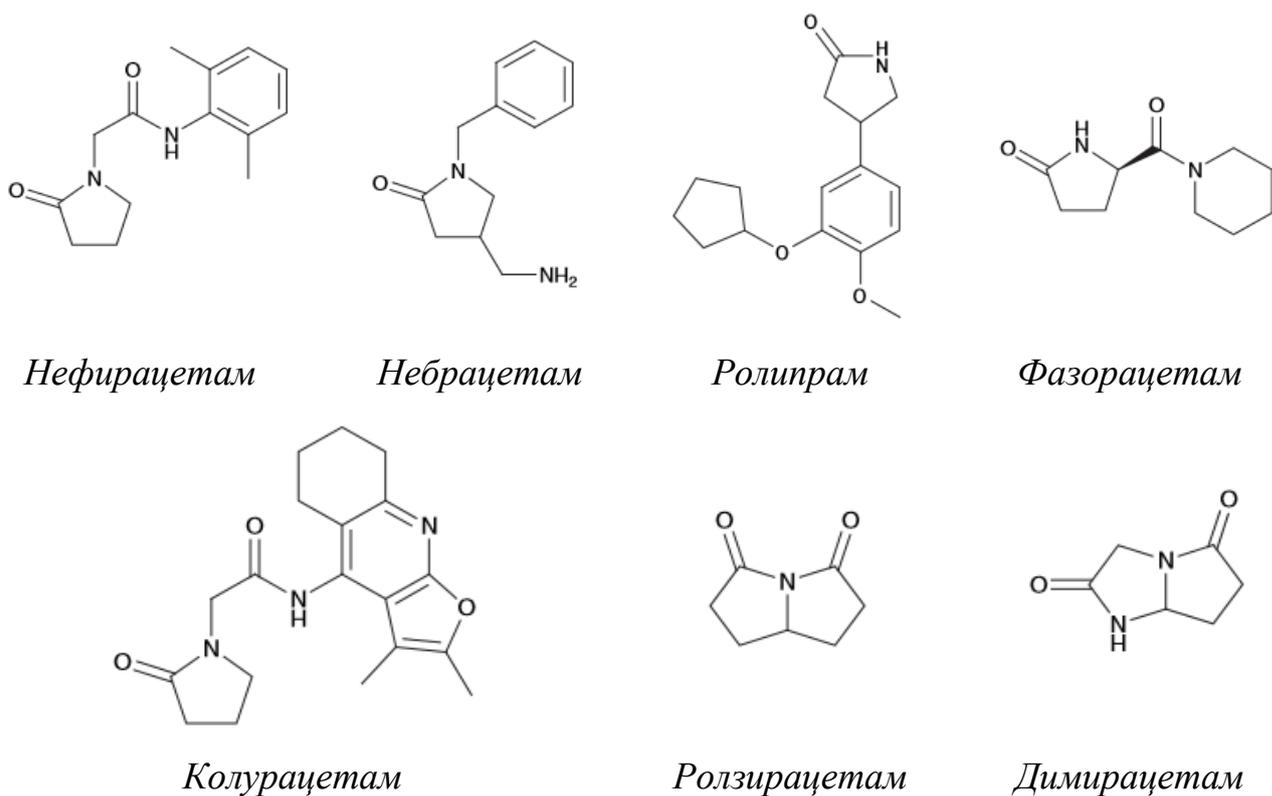
3. Нефирацетам, ролипрам. Клиническая эффективность препаратов данной группы неизвестна. Нефирацетам, для которого не удалось доказать эффективность в улучшении когнитивных функций у пациентов, перенесших инсульт и ролипрам, который в настоящее время исследуется в качестве антидепрессанта. В эту подгруппу входит и ряд других препаратов, находящихся на стадии клинических исследований: небрацетам, колурацетам, фазорацетам, ролзирацетам, димирацетам.



**Рисунок 1.1 - Структурные формулы рацетамов из первой группы**



**Рисунок 1.2 - Структурные формулы рацетамов из второй группы**



**Рисунок 1.3 - Структурные формулы рацетамов из третьей группы**

Пирацетам в сравнении с другими препаратами данной группы обладает наиболее широким спектром действия и обширной базой клинической эффективности, что позволяет рассматривать его в качестве "эталонного" представителя данной группы [6, 8, 9, 48].

Изучение связи «структура-активность» соединений из группы рацетамов, а также понимание механизма их действия необходимо для разработки препаратов с хорошо сбалансированной фармакокинетикой и активностью, которые будут полезны в лечении когнитивных заболеваний, а также при дополнительных показаниях.

## 1.2. Фармакокинетика ноотропов из группы рацетамов

Изучение фармакокинетики на животных является неотъемлемой частью доклинических исследований потенциального препарата, предшествующей его регистрации и широкому медицинскому применению. Целью изучения фармакокинетики является количественная оценка процессов всасывания, распределения и элиминации фармакологического средства [44].

На основе фармакокинетической характеристики лекарственного препарата определяют дозы, оптимальный путь введения, режим дозирования лекарственных средств и продолжительность курса лечения. Регулярный контроль содержания лекарственного средства в биологических жидкостях позволяет своевременно корректировать лечение [5, 34].

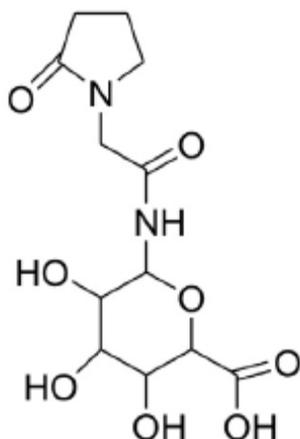
Наиболее полную и изученную фармакокинетическую картину имеют соединения из 1 группы рацетамов.

**Пирацетам.** Пирацетам хорошо всасывается после перорального применения, биодоступность составляет почти 100%. После приема препарата в дозе 800 мг максимальная концентрация в плазме составляет 18 мкг/мл [93, 138].

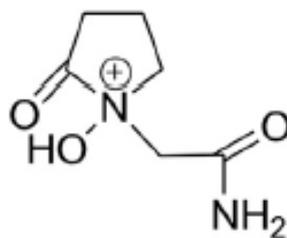
У крыс концентрация в плазме после перорального введения пирацетама в дозе 300 мг/кг составляет около 180 мкг/мл.

Пирацетам практически в неизменном виде выводится с мочой и полностью удаляется из организма через 30 часов.

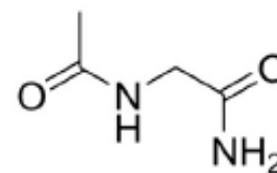
Путем компьютерного моделирования (*In silico*) были описаны возможные метаболиты пирацетама [73]. Их структурные формулы и молекулярные массы приведены на рисунке 1.4.



М.м. 318,28



М.м. 159,16



М.м. 116,12

**Рисунок 1.4 – Возможные метаболиты пирацетама**

Период полувыведения в ЦНС (7,7 ч) больше, чем период полувыведения в плазме крови (5 ч), это связано с тем, что со временем некоторое количество пирацетама накапливается в мозге.

Пирацетам плохо проникает через гематоэнцефалический барьер из-за высокой гидрофильности и достигает пиковых концентраций в ЦНС (около 10 мкг/мл) через 3 часа после приема 1 г препарата.

Основные фармакокинетические параметры для пирацетама описаны в работе [86]:  $t_{1/2} = 4,40 \pm 0,179$ ;  $T_{\max} = 2,33 \pm 0,105$ ;  $C_{\max} = 14,53 \pm 0,282$  мкг/мл;  $AUC_{(0-\infty)} = 59,19 \pm 4,402$  мкг · ч/мл;  $AUMC_{(0-\infty)} = 367,23 \pm 38,96$  мкг · (ч)<sup>(2)/</sup>мл;  $K_e = 0,16 \pm 0,006$  ч;  $MRT = 5,80 \pm 0,227$  ч;  $V_d = 96,36 \pm 8,917$  л.

**Оксирацетам.** Оксирацетам хорошо абсорбируется из ЖКТ после перорального применения, биодоступность составляет по разным источникам 68-82% [118] и 56% [64].

Фармакокинетические исследования показали, что основным метаболитом оксирацетама является 4-гидрокси-2-оксо-1-пирролидин уксусная кислота. После внутривенного введения более 90% вещества выводится с мочой в неизменном виде в течение 48 часов. После перорального применения почти 50% выводится с мочой в течение 6 часов [64, 78, 113, 118].

Максимальная концентрация в крови достигается через 1-3 часа после приема оксирацетама и составляет 19-31 мкг/мл [113].

Период полувыведения у здоровых людей составляет около 8 часов, тогда как у пациентов с почечной недостаточностью могут наблюдаться длительные периоды полураспада в течение 10-68 ч [119].

Небольшое количество оксирацетама проникает через гематоэнцефалический: через 1 час после введения в количестве 2 г в ЦНС обнаруживается 2,8 мкг/мл, что соответствует концентрации 5,3% в плазме крови [64, 77].

**Фенотропил.** При экспериментальном изучении фармакокинетики фенотропила у крыс [2] были изучены различные способы введения препарата: перорально, внутримышечно и внутривенно. При приеме фенотропила внутрь абсолютная биодоступность составляет 100%, максимальная концентрация в крови, в печени, почках и мозге наблюдается через 1 час, в сердце – через 1,5 часа. Фенотропил не метаболизируется в организме, с мочой выводится около 40% от введенной дозы в неизменном виде.

**Прамирацетам.** После перорального введения прамирацетама в дозе 400-1600 мг максимальные концентрации в плазме достигаются через 2-3 часа и составляют 2,7-9,0 пг/мл. Период полувыведения (4,5-6,5 ч), общий клиренс тела (4,45-4,85 мл/кг/мин), почечный клиренс (1,8-3,0 мл/кг/мин) и средний объем распределения (1,8-2,9 л/кг) не зависят от дозы [71, 93, 117].

Прамирацетам не метаболизируется в печени, выводится главным образом с мочой в неизменном виде и не связывается с белками плазмы крови [72].

**Нефирацетам.** Метаболизм нефирацетама был изучен у человека (рисунок 1.5); он инициируется обширным гидроксированием пирролидинового кольца и фенильной группы, после чего гидроксированные соединения подвергаются дальнейшему распаду или субстратному конъюгированию. Основными метаболитами нефирацетама являются N- (2,6-диметилфенил)-4-гидрокси-2-пирролидинон (МН-4), N- (2,6-диметилфенил) -5 гидроксид-2-пирролидинон (МН-2) и N- (2,6-диметилфенил) карбамоилметилсукциаминовую кислоту (МН-9). М

Менее 8% перорально вводимой дозы выводилось без изменений с мочой. Максимальная концентрация в плазме крови (10 мкМ) достигалась через 2 часа после приема нефирацетама в дозе 100 мг [67, 92, 93, 132].

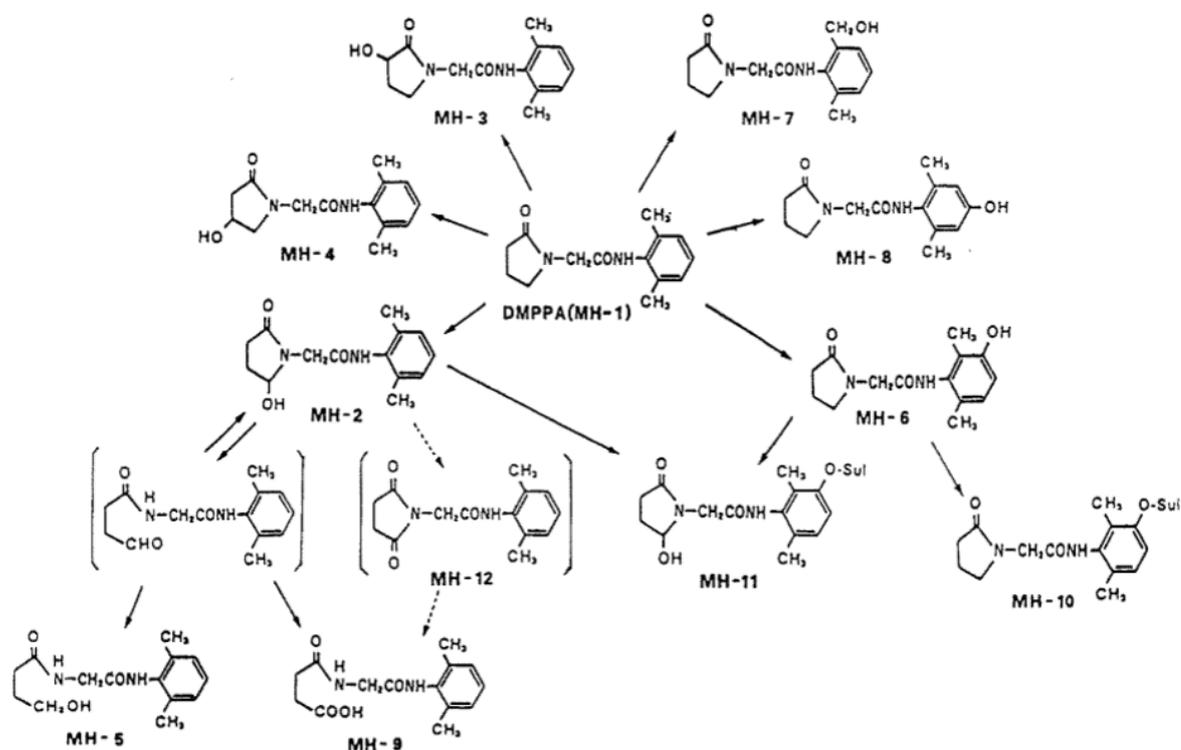


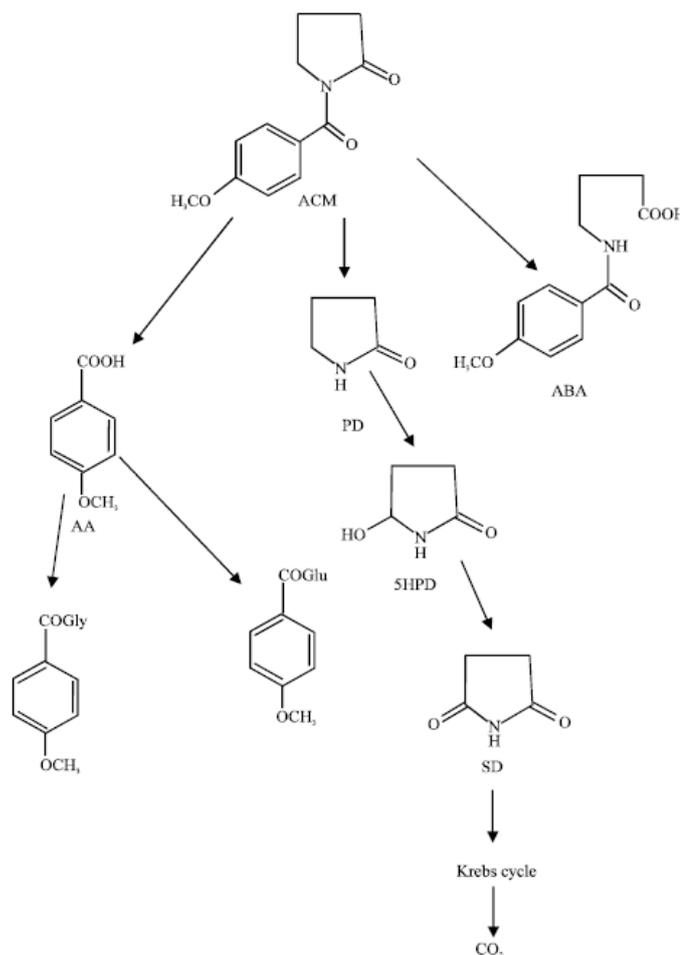
Рисунок 1.5 - Схема метаболизма нефирацетама

**Анирацетам.** Анирацетам очень быстро всасывается из ЖКТ после перорального применения, однако абсолютная системная биодоступность составляет лишь около 0,2%, общий клиренс анирацетама достигает 10 л/мин.

$C_{\max}$  после перорального приема доз 300 и 1200 мг соответственно в виде таблеток у здоровых добровольцев составила 2,3 и 14,1 мкг/л соответственно. После внутривенного введения анирацетама 100 мг объем распределения в установившемся состоянии рассчитывался как 2,5 л/кг. Связывание с белками плазмы составляло 66%, период полувыведения препарата составляет 35 мин.

Основными метаболитами анирацетама являются N-анизоил- $\gamma$ -аминомасляная кислота (N-анизоил-ГАМК), 2-пирролидинон, сукцинимид и

анисовая кислота, которые выделяются через мочу (84%), фекалии (2%), или как  $\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе (рисунок 1.6). [70, 93, 95, 110, 126, 129]



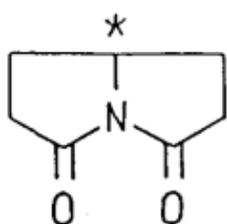
**Рисунок 1.6 - Схема метаболизма анирацетама**

**Ролзирацетам.** Метаболизм ролзирацетама исследовался на обезьянах, собаках и крысах после перорального и внутривенного введения.

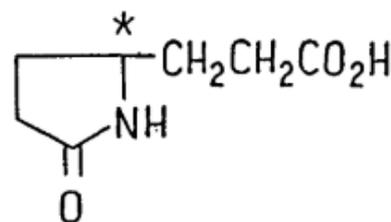
После внутривенного введения препарат быстро удаляется из системного кровообращения, период полувыведения в данном случае составляет менее 25 мин, при этом образуется 5-оксо-2-пиридинопропановая кислота, единственный метаболит ролзирацетама.

После перорального приема в плазме могут быть обнаружены только следы нативного лекарственного средства, в то время как метаболит (5-оксо-2-пирролидинпропановая кислота) достигает пикового уровня через 0,5 ч после введения, что указывает на быстрое всасывание. Основная часть ролзирацетама и

его метаболита выделяются почками (90%), и менее 5% выводится с калом [41]. Небольшое количество вещества обнаруживаются в мозге из-за полярной структуры метаболита (рисунок 1.7). Однако сам препарат может накапливаться в головном мозге в достаточном количестве [68].



а)



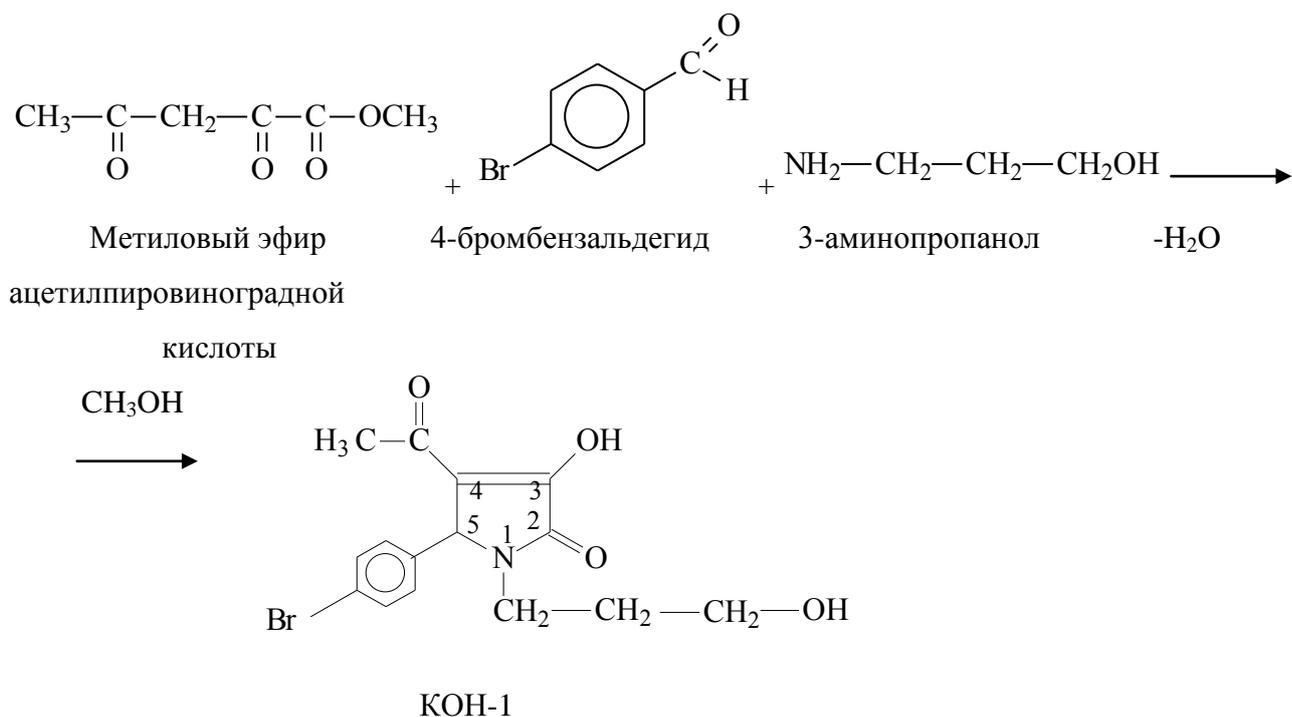
б)

**Рис. 1.7 - Структурные формулы ролзирацетама (а) и его метаболита (б)**

**Фазорацетам.** После перорального введения фазорацетама крысам фазорацетам быстро всасывается (максимальная концентрация наступает через 0,5 часа), распределяется и выводится почками практически без изменений. Биодоступность у крыс, собак и обезьян составила 97, 90 и 79% с периодом полураспада 0,91, 2,8 и 1,3 ч соответственно [103, 115, 116]

### 1.3. Характеристика биологически активного соединения КОН-1

4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он (КОН-1) синтезирован в Пермской государственной фармацевтической химии под руководством профессора Гейна В.Л. путем трехкомпонентной реакции метилового эфира ацетилпировиноградной кислоты со смесью 4-бромбензальдегида и 3-амино-1-пропанола, при кратковременном нагревании в водно-спиртовой или спиртовой среде [15, 16, 29].



Субстанция КОН-1 представляет собой белый мелкокристаллический порошок, без запаха, практически не растворимый в воде, малорастворимый в спирте и легко растворимый в диметилформамиде [25].

В эксперименте на животных, на модели условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), было показано, что КОН-1 проявляет более высокое антиамнестическое действие, чем пирацетам, вследствие чего соединение рекомендовано для доклинических исследований в качестве ноотропного средства [61].

В структуре КОН-1 имеется енольная гидроксильная группа, которая придает соединению слабые кислотные свойства и обуславливает взаимодействие с гидроксидами щелочных металлов с образованием солей (значение  $pK_a$  в водно-спиртовых растворах составляет  $3,21 \pm 0,03$ , в водно-диметилформамидных  $4,85 \pm 0,07$ ) [25].

Способность к поглощению КОН-1 в УФ-области обусловлена электронными переходами внутри пирролинового цикла. УФ-спектр соединения в нейтральном растворителе (спирт 96%) и 0,01 М растворе натрия гидроксида (рН 12) имеют один четко выраженный максимум поглощения при  $328 \pm 2$  нм,

минимум – при  $283 \pm 2$  нм. В кислой среде (0,01М растворе кислоты хлористоводородной) наблюдается гипсохромный сдвиг поглощения КОН-1 в область 230 - 260 нм [25, 39].

На субстанцию разработан проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП), содержащий перечень методов и показателей контроля качества исследуемого соединения.

Для определения его подлинности предложены методы инфракрасной спектроскопии, ультрафиолетовой спектрофотометрии, а также качественные реакции с железа (III) хлоридом, меди (II) сульфатом, кислотой серной концентрированной и раствором формальдегида в серной кислоте [24, 25, 26, 38, 39].

Для количественного определения КОН-1 предложены методики алкалометрического титрования (субстанция); спектрофотометрии в УФ и видимой области (таблетки) [20, 23, 27]. Для определения примесей (метилловый эфир ацетилпировиноградной кислоты и 4-бромбензальдегид) разработан метод ВЭЖХ с УФ-детектированием [13, 22].

#### **1.4. Особенности биоаналитического этапа исследований фармакокинетики ноотропов**

Любое фармакокинетическое исследование включает в себя биоаналитический этап (подготовка образца и детектирование исследуемого соединения) и собственно расчет фармакокинетических параметров [34]. Объектами исследования при доклиническом изучении фармакокинетики чаще всего являются плазма крови, цельная кровь, различные органы и ткани, моча, фекалии лабораторных животных.

##### **1.4.1. Пробоподготовка биологических объектов**

Пробоподготовка является важным и трудоемким этапом в анализе лекарственных средств в биологических объектах, в ходе которого удаляются сопутствующие вещества, мешающие проведению анализа. К таким веществам

относятся белки, липиды, биогенные амины, клеточные структуры, форменные элементы, которые способны связываться с неподвижной фазой (НФ) или коагулировать при взаимодействии с компонентами подвижной фазы (ПФ), в результате чего нарушается ток ПФ через капилляры хроматографа или хроматографическую колонку, снижается ее эффективность и резко повышается гидродинамическое сопротивление в ней [14, 59, 140]. Также данные вещества оказывают мешающее влияние при масс-спектрометрическом определении анализируемых веществ, влияя на их ионизацию [62].

### **Изолирование лекарственных веществ из плазмы крови**

Определение концентрации препарата в крови позволяет получить информацию о продолжительности циркуляции лекарственного средства в организме, его биодоступности, влиянии концентрации на фармакологический эффект, терапевтической и летальной дозах, динамике образования активных и токсичных метаболитов [42, 75].

Современные методы пробоподготовки плазмы направлены либо на удаление мешающих компонентов (экстракция липидов, осаждение белков) с последующим анализом супернатанта, либо на селективном извлечении анализируемого вещества из биологической матрицы методами экстракции: жидкостная жидкостная экстракция и сорбционное концентрирование (твердофазная экстракция) [59].

#### *Прямое осаждение белков плазмы крови*

Самым простым и быстрым способом пробоподготовки плазмы крови является осаждение белков плазмы крови путем добавления к пробе органических растворителей, неорганических солей или сильных кислот с последующим центрифугированием [59].

При изолировании нового биологически активного соединения, производного ГАМК, из биологических проб производили из плазмы, сыворотки и цельной крови, а также из 20% водных гомогенатов органов и тканей крыс

использовали метод осаждения белков. В качестве осадителей использовали ацетонитрил, метанол, концентрированную хлористоводородную кислоту. Образец встряхивают в течение 10 минут в ультразвуковой ванне для преципитации белков, и далее центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин. Наилучшая экстракция достигается с использованием концентрированной хлористоводородной кислоты в соотношении с плазмой 1:0,2 [46].

Прямое исследование супернатанта использовалось при фармакокинетических исследованиях фенибута. Извлечение фенибута производили из плазмы, сыворотки, цельной крови, водных гомогенатов органов и тканей крыс 10% раствором трихлоруксусной кислоты. После встряхивания в ультразвуковой ванне образцы центрифугировали при 3000 об/мин [40].

При анализе образцов плазмы крови в фармакокинетических исследованиях ряда ноотропных средств из группы рацетамов для осаждения использовали следующие реагенты:

- метанол (в анализе анирацетама) [70];
- ацетонитрил (в анализе оксирацетама, пирацетама, леветирацетама) [87, 125, 134];
- 5 % раствор трихлоруксусной кислоты (в анализе пирацетама) [84];
- хлорная кислота (в анализе пирацетама) [79].

#### *Жидкость-жидкостная экстракция*

Эффективным и распространенным методом, применяющимся при извлечении веществ из плазмы крови, является *жидкость-жидкостная экстракция*. Данный способ пробоподготовки является более селективным в сравнении с осаждением белков, позволяет снизить влияние матричного эффекта, отличается несложной реализацией и невысокой стоимостью [66].

При ее проведении в качестве экстрагента чаще всего применяются органические растворители: этилацетат, диэтиловый эфир, гексан, дихлорметан, хлороформ и т.п. После экстракции производится удаление экстрагента (упаривание под вакуумом, в токе азота, высушивание в токе теплого воздуха).

Далее сухой остаток перерастворяется в подходящем растворителе. Полученный раствор может быть введен в хроматограф.

Данный метод использовался при фармакокинетических исследованиях фенотропила. Соединение извлекали из плазмы крови и мочи 40-кратным количеством хлороформа без изменения рН среды. Хлороформный слой отделяли после вымораживания водной фазы при температуре  $-15^{\circ}\text{C}$  и упаривали на роторном испарителе до объема 2-3 мл [2].

При изучении фармакокинетики дипептидного ноотропного препарата «Ноопепт» экстракцию аналита из плазмы крыс (2 мл) производили 10-кратным объемом хлороформа [57].

Для определения анирацетама в плазме крови в качестве экстрагента использовали этилацетат [95, 131], для пирацетама – этилацетат [133] и смесь гексан – 2-пропанол [85].

#### *Твердофазная экстракция*

Твердофазная экстракция (ТФЭ) - способ пробоподготовки, в котором применяется сорбент (твердая неподвижная фаза) для концентрирования и отделения целевого компонента или компонентов с последующим элюированием (вымыванием) подходящим растворителем. Этот метод используется для селективного извлечения, концентрирования и очистки образца перед анализом спектральными, электрохимическими, хроматографическими и другими методами. Как метод подготовки пробы при изучении фармакокинетики используется недостаточно широко. ТФЭ позволяет получать высокоочищенные пробы, содержащие небольшое количество посторонних веществ. По трудоемкости ТФЭ сопоставима с ЖЖЭ, а часто сопровождается и большим количеством этапов [135, 147].

Разделение аналита и примесей в ТФЭ может быть реализовано с помощью следующих процессов [109]:

- селективная экстракция, при которой на слое сорбента во время процесса прохождения образца через патрон сохраняются только анализируемые

соединения, в то время как остальные компоненты пробы (примеси) не удерживаются на слое;

- селективная промывка, когда представляющие интерес соединения и примеси остаются на слое сорбента при прохождении образца. Затем примеси удаляют с помощью промывных растворов, при этом анализируемое соединение остается на сорбенте;

- селективное элюирование, когда интересующие адсорбированные соединения элюируются в растворителе.

Данный способ пробоподготовки использовался в анализе оксиацетама [82].

### **Изолирование лекарственных веществ из мочи**

Выбор способа пробоподготовки мочи к анализу зависит от физико-химических свойств лекарственного средства [42]. Так, для препаратов с гидрофильными свойствами используют лиофилизацию и гидролиз (включая ферментативный) с последующей экстракцией.

Для липофильных препаратов применяется жидкость-жидкостная экстракция органическими растворителями с последующим выпариванием растворителя (концентрированием). Этот вариант использовали для пробоподготовки мочи к определению оксиацетама [83, 93].

При определении пирасетама в моче [87] использовали прямой ввод образца, для этого биожидкость разводили водой в 2 раза, выдерживали на ультразвуковой ванне в течение 5 мин, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

### **Изолирование лекарственных веществ из внутренних органов**

Большая часть лекарственных средств неравномерно распределяется в организме животных. На это влияют различные факторы: наличие гистогематических барьеров, функциональное состояние и кровоснабжение органа, сродство молекулы препарата с биохимическими структурами органов и

тканей. Важным фактором, определяющим распределение лекарственного средства, является скорость его диффузии в различные ткани.

При проведении фармакокинетических исследований важно выявить органы и ткани, обладающие наибольшей тропностью к изучаемому соединению, поскольку это позволит более детально изучить механизм действия лекарственных веществ на этапе подбора оптимальной дозировки препарата.

Так, распределение ноотропов в организме лабораторных животных изучают в следующих органах: орган потенциального действия препарата - мозг; органы, богатые кровеносными сосудами — сердце, лёгкие и селезёнка; а также в органах, обеспечивающих метаболизм и выведение веществ из организма — печень и почки.

Для извлечения лекарственных веществ из биологических материалов в практике химико-токсикологического анализа используют различные методы изолирования, которые могут быть применены и в исследованиях фармакокинетики [51]. К ним относятся общие методы (Васильевой, Стаса-Отто) и частные (Валова, Крамаренко и др.).

Однако в большинстве случаев при изучении фармакокинетики новых биологически активных соединений разрабатываются частные методики с учётом физико-химических свойств определяемого вещества.

Так, для изолирования ноотропного препарата ГВС-111 разработана методика его изолирования из мозга крыс [56]: мозг извлекали, промывали, высушивали, взвешивали, измельчали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в течение 1 мин в дистиллированной воде в соотношении 1:3. К гомогенатам мозга добавляли 5-кратный объем ацетонитрила и экстрагировали при встряхивании в течение 10 мин. Затем образцы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Ацетонитрильные экстракты высушивали, а осадки подвергали повторному экстрагированию 5-кратным объемом хлороформа, повторно центрифугировали при тех же условиях и высушивали. Полученные после 2-кратной экстракции осадки растворяли в дистиллированной воде и хроматографировали на колонке «Ultrasphere - ODS».

Литвиным Е.А. с соавторами была предложена методика изолирования гимантана из мозга белых крыс [55]: мозг отмывали физиологическим раствором от крови; 1 г мозга измельчали и гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора с добавлением 0,5 мл 96% этилового спирта в электрогомогенизаторе. Смесь центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант отделяли и исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

#### **1.4.2. Аналитические методы в фармакокинетических исследованиях ноотропов**

При проведении фармакокинетических исследований в основном используются высокочувствительные, специфичные хроматографические методы (газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография с различными вариантами детектирования), которые позволяют определять низкие уровни концентраций аналитов (нг, пг) в извлечениях из биологических объектов [42, 75]. Метод ВЭЖХ является основным в анализе соединений, производных рацетамов.

Анализ анирацетама в извлечениях из плазмы крови при фармакокинетических исследованиях и исследованиях биоэквивалентности проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием с использованием ионных переходов  $235.8 \rightarrow 106.6$  [70, 95, 114, 131]. В качестве внутреннего стандарта для количественного определения анирацетама использовали эстазолам [131], лизиноприл [70].

Оксирацетам в плазме крови определяли методом ВЭЖХ с масс-селективным ( $m/z$   $159.00 \rightarrow 141.94$ ,  $159.95 \rightarrow 113.98$  и  $142.98 \rightarrow 125.97$ ) [78, 84, 125, 134] или флуориметрическим [82] детектором. В количественном анализе пирацетам использовали в качестве внутреннего стандарта [125, 134].

Для определения пирацетама предложен метод ВЭЖХ – МС/МС с ионизацией электроспреем в положительном режиме ( $m/z$   $142.98 \rightarrow 125.97$ ) [73, 84, 134]. Хроматографическое разделение проводили на обращено-фазной колонке

Zorbax SB-Aq (150 × 2.1 mm, 3.5 μm), подвижная фаза: ацетонитрил – 1% муравьиная кислота [93]. Условия масс-спектрометрического определения подробно описаны в статьях [73, 84].

Также анализ парацетама проводили с помощью ВЭЖХ с УФ-детектором [79, 133]. Разделение осуществляли с помощью градиентного элюирования при комнатной температуре на колонке RP-18 LiChrospher 100, с водной подвижной фазой, содержащей ацетонитрил и метанол. Детектирование проводили при 200 нм, ПКО составил 0,2 мкг/мл [79]. Также описан изократический режим ВЭЖХ, длина волны детектирования - 215 нм при определении парацетама в плазме и спинномозговой жидкости [88].

Для определения парацетама в плазме и моче предложен метод жидкостной хроматографии с определением оптической плотности при длине волны 206 нм и изократическим режимом элюирования. Калибровочные графики строили в диапазоне 3-40 мг/л в плазме и 100-2000 мг/л в моче. Пределы количественного определения составили 3 мг/л в плазме и 100 мг/л в моче. Анализ был использован при фармакокинетических исследованиях у человека [85].

В статье [87] также описан метод ВЭЖХ с УФ-детектированием. Анализ проводили при комнатной температуре, подвижная фаза состояла из триэтиламина и ацетонитрила (70:30), рН 6,5 (доводили с помощью фосфорной кислоты) скорость потока - 1,0 мл /мин, длина волны детектирования - 205 нм.

Определение фенотропила в биологических объектах осуществляли методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. В качестве внутреннего стандарта был использован 2,4,5,7,8,10-гексаметил-2,4,8,10-тетраазабицикло[4.4.0]декандион-3,9 (представитель конденсированных биомочевин) [28].

### **1.4.3. Валидация биоаналитических методик**

Любая биоаналитическая методика должна быть подвергнута валидации. Это необходимо для подтверждения надежности метода количественного определения аналита в различных биологических матрицах.

Основными руководствами, регламентирующими проведение валидации биоаналитических методик, являются:

- «Руководство по экспертизе лекарственных средств», т.1, глава 7 «Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств», Приложение III «Валидация методики» (ФГБУ НЦЭСМП, М., 2013) [45];
- «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов» в рамках Евразийского экономического союза, утвержденных Евразийской экономической комиссией от 03.11.2016 № 85 [43];
- Guideline on bioanalytical method validation (European Medicines Agency, 2011 г.) [97];
- Bioanalytical Method Validation (Guidance for Industry, U.S. Food and Drug Administration, 2013 г.) [96].

Основными валидационными характеристиками биоаналитических методик являются специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел обнаружения и предел количественного определения.

*Специфичность* – способность методики однозначно определять анализируемое вещество и внутренний стандарт в присутствии эндогенных компонентов матрицы или других компонентов, содержащихся в пробе.

*Линейность* – это способность методики (в пределах определенного диапазона) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце. Величина относительной величина погрешности для точки, соответствующей пределу количественного определения, не должна превышать 20%, для остальных точек – 15%.

*Прецизионность* – описывает близость повторяющихся результатов индивидуальных измерений анализируемого вещества, выполненных по данной методике.

*Правильность* – описывает близость определяемого значения, полученного по данной методике, к номинальной концентрации анализируемого вещества.

При оценке прецизионности и правильности величина стандартного отклонения и относительная величина погрешности для точки, соответствующей пределу количественного определения, не должны превышать 20%, для остальных точек – 15%.

*Предел обнаружения* – минимальное количество анализируемого вещества в пробе, которое может быть обнаружено.

*Предел количественного определения* – минимальное количество анализируемого вещества в пробе, которое может быть определено с достаточной точностью и прецизионностью.

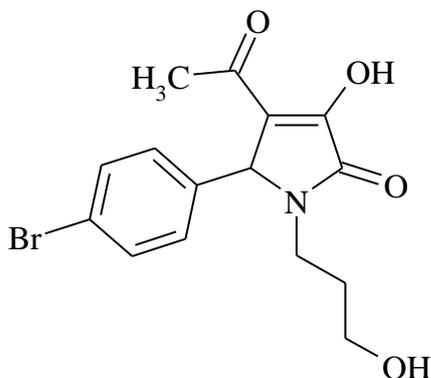
## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. В настоящее время продолжается разработка и поиск новых эффективных и безопасных ноотропных препаратов, что говорит о востребованности данной группы лекарственных средств.
2. Лекарственные препараты из группы рацетамов, несмотря на многолетний опыт применения в медицинской практике, занимают ведущие позиции среди ноотропных средств, благодаря широкому спектру ноотропной активности, а также большой доказательной базе клинической эффективности.
3. В Пермской государственной фармацевтической академии синтезировано новое биологически активное соединение из группы производных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она – КОН-1, которое проявило более высокое антиамнестическое действие, чем пирацетам, вследствие чего рекомендовано для доклинических исследований в качестве потенциального ноотропного средства.
4. При проведении фармакокинетических исследований основной задачей является количественная оценка процессов всасывания, распределения и элиминации фармакологического средства. Изучение фармакокинетики нового биологически активного соединения требует создания высокочувствительных и надежных методик их определения в биологических объектах.
5. Разработка биоаналитических методик включает выбор оптимальных условий извлечения биологически активного соединения из биологической матрицы и аналитического метода, позволяющего селективно определять вещество в присутствии эндогенных веществ. Важным этапом является валидация разработанной методики для подтверждения ее пригодности заявленному назначению.
6. Анализ литературы, касающийся фармакокинетических исследований препаратов группы рацетамов, показал, что наиболее востребованным методом их определения в биологических объектах является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными вариантами детектирования.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

#### Субстанция КОН-1

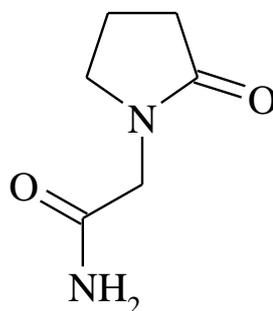


4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он

Описание. Бесцветное кристаллическое вещество, легко растворимое в диметилформамиде (1:10), растворимое в спирте 96% (1:25), умеренно растворимое в ацетоне (1:50), практически не растворимое в воде (1: более 10000) [25].

Субстанция синтезирована в Пермской государственной фармацевтической академии, удовлетворяет требованиям проекта ФСП [26], содержание действующего вещества 99,94 %.

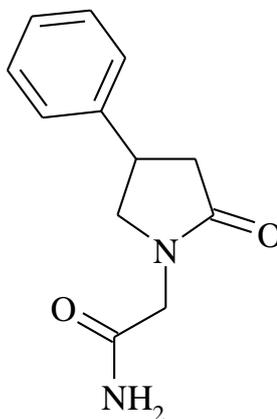
#### Субстанция пирацетама (АО "Органика", Россия)



2-оксо-1-пирролидинацетамид

Описание. Белый кристаллический порошок, легко растворим в воде, растворим в спирте 96%, мало растворим в хлороформе. Субстанция удовлетворяет требованиям ФС 42-0269-07.

Субстанция фенотропила (ФГУП "СКТБ "Технолог")



N-карбамоилметил-4-фенил-2-пирролидон

Описание. Белый или белый с желтоватым или кремоватым оттенком кристаллический порошок горьковатого вкуса без запаха. Растворим в воде, хлороформе, спирте этиловом, трудно растворим в эфире, ацетоне [2]. Субстанция удовлетворяет требованиям ФСП 42-0348-4414-03.

### Биологические объекты

- плазма крови, полученная из донорских пунктов;
- моча;
- печень лабораторных животных;
- плазма, моча и внутренние органы, отобранные до введения субстанции КОН-1 в организм лабораторных животных (контрольные образы);
- плазма, моча и внутренние органы, отобранные в течение определенного времени после введения субстанции КОН-1 в организм лабораторных животных.

Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с правовыми нормами использования животных при проведении доклинических

исследований согласно приказу от 23.08.2010 г. N 708-н «Об утверждении правил лабораторной практики».

### **Приготовление стандартных растворов КОН-1:**

200 мкг/мл (исходный раствор): около 0,01 г субстанции КОН-1 (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл метанола и доводят до метки метанолом.

Рабочие растворы с необходимыми концентрациями готовят путем разбавления исходного раствора водой очищенной.

40 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу вместимостью 25 мл и доводят водой очищенной до метки.

20 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу вместимостью 50 мл и доводят водой очищенной до метки.

10 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу вместимостью 100 мл и доводят водой очищенной до метки.

5 мкг/мл: к 2 мл раствора 20 мкг/мл добавляют 6 мл воды очищенной.

1 мкг/мл: к 1 мл раствора 10 мкг/мл добавляют 9 мл воды очищенной

Исходные стандартные растворы хранили при температуре 5°C (холодильник), рабочие стандартные растворы использовали свежеприготовленными.

### **Приготовление модельных смесей плазмы крови и КОН-1:**

10 мкг/мл: к 2 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 6 мл плазмы крови.

5 мкг/мл: к 1 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 7 мл плазмы крови.

2 мкг/мл: к 0,5 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 9,5 мл плазмы крови

**Приготовление модельных растворов плазмы крови и КОН-1 для проведения валидации методики количественного определения КОН-1 методом прямого осаждения белков плазмы крови с последующим анализом извлечений методом ВЭЖХ-УФ:**

1. Установление линейности методики

1882,4 мкг/мл (исходный раствор): 0,04706 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола и доводят до метки метанолом.

75,3 мкг/мл: 1 мл раствора 1882,4 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки водой.

9400 нг/мл: к 0,5 мл раствора 75,3 мкг/мл добавляют 3,5 мл плазмы крови

6840 нг/мл: к 0,5 мл раствора 75,3 мкг/мл добавляют 5,0 мл плазмы крови

5380 нг/мл: к 0,5 мл раствора 75,3 мкг/мл добавляют 6,5 мл плазмы крови

2690 нг/мл: к 1 мл раствора 5380 нг/мл добавляют 1 мл плазмы крови

1080 нг/мл: к 1 мл раствора 5380 нг/мл добавляют 4 мл плазмы крови

540 нг/мл: к 1 мл раствора 1080 нг/мл добавляют 1 мл плазмы крови

270 нг/мл: к 1 мл раствора 1080 нг/мл добавляют 3 мл плазмы крови

108 нг/мл: к 1 мл раствора 1080 нг/мл добавляют 9 мл плазмы крови

54 нг/мл: к 1 мл раствора 108 нг/мл добавляют 1 мл плазмы крови

36 нг/мл: к 1 мл раствора 108 нг/мл добавляют 2 мл плазмы крови

## 2. Определение правильности и прецизионности

1506 мкг/мл: 0,03765 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола и доводят до метки метанолом.

150,6 мкг/мл: 1 мл раствора 1506 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки водой очищенной.

7530 нг/мл: к 0,5 мл раствора 150,6 мкг/мл добавляют 9,5 мл плазмы крови

4706 нг/мл: к 0,5 мл раствора 150,6 мкг/мл добавляют 15,5 мл плазмы крови

1176 нг/мл: к 1 мл раствора 4706 нг/мл добавляют 3 мл плазмы крови

784 нг/мл: к 0,5 мл раствора 4706 нг/мл добавляют 2,5 мл плазмы крови

120 нг/мл: к 1 мл раствора 784 нг/мл добавляют 5,5 мл раствора плазмы крови

39 нг/мл: к 0,5 мл раствора 784 нг/мл добавляют 9,5 мл плазмы крови

3. Определение предела количественного определения (ПКО) и предела обнаружения (ПО):

30 нг/мл: к 1 мл раствора 120 нг/мл добавляют 3 мл плазмы крови

20 нг/мл: к 1 мл раствора 120 нг/мл добавляют 5 мл плазмы крови

**Приготовление модельных растворов плазмы крови и КОН-1 для проведения валидации методики количественного определения КОН-1 методом жидкость-жидкостной экстракции с последующим анализом извлечений методом ВЭЖХ-МС/МС:**

1. Установление линейности методики

1840 мкг/мл: 0,04600 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола и доводят до метки метанолом

184 мкг/мл: 1 мл раствора 1840 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки водой очищенной

36,8 мкг/мл: к 1 мл раствора 184 мкг/мл добавляют 4 мл воды очищенной

9200 нг/мл: к 1 мл раствора 36,8 мкг/мл добавляют 3 мл плазмы крови

7360 нг/мл: к 1 мл раствора 36,8 мкг/мл добавляют 4 мл плазмы крови

5260 нг/мл: к 1 мл раствора 36,8 мкг/мл добавляют 6 мл плазмы крови

2630 нг/мл: к 1 мл раствора 5260 нг/мл добавляют 1 мл плазмы крови

1050 нг/мл: к 1 мл раствора 5260 нг/мл добавляют 4 мл плазмы крови

526 нг/мл: к 0,5 мл раствора 5260 нг/мл добавляют 4,5 мл плазмы крови

263 нг/мл: к 1 мл раствора 526 нг/мл добавляют 1 мл плазмы крови

130 нг/мл: к 1 мл раствора 526 нг/мл добавляют 3 мл плазмы крови

43 нг/мл: к 1 мл раствора 130 нг/мл добавляют 2 мл плазмы крови

2. Определение правильности и прецизионности

1472 мкг/мл: 0,03680 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола и доводят до метки метанолом

73,6 мкг/мл: 0,5 мл раствора 1472 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки водой очищенной

6690 нг/мл: к 0,5 мл раствора 73,6 мкг/мл добавляют 5 мл плазмы крови

3680 нг/мл: к 0,5 мл раствора 73,6 мкг/мл добавляют 9,5 мл плазмы крови

1230 нг/мл: к 1 мл раствора 3680 нг/мл добавляют 2 мл плазмы крови

530 нг/мл: к 1 мл раствора 3680 нг/мл добавляют 6 мл плазмы крови

110 нг/мл: к 5 мл раствора 530 нг/мл добавляют 9,5 мл плазмы крови

36 нг/мл: к 0,5 мл раствора 530 нг/мл добавляют 6,8 мл плазмы крови

### 3. Определение ПКО и ПО

40 нг/мл: к 1 мл раствора 130 нг/мл добавляют 2 мл плазмы крови

10 нг/мл: к 1 мл раствора 110 нг/мл добавляют 9 мл плазмы крови

### **Приготовление модельных смесей мочи и КОН-1:**

20 мкг/мл: 2,5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу вместимостью 25 мл и доводят мочой до метки.

10 мкг/мл: к 5 мл раствора 20 мкг/мл добавляют 5 мл мочи.

5 мкг/мл: к 2 мл раствора 20 мкг/мл добавляют 6 мл мочи.

2 мкг/мл: к 1 мл раствора 20 мкг/мл добавляют 9 мл мочи.

### **Приготовление модельных растворов мочи и КОН-1 для проведения валидации методики количественного определения КОН-1 методом жидкость-жидкостной экстракции с последующим анализом извлечений методом ВЭЖХ-УФ:**

#### 1. Установление линейности методики

1882,5 мкг/мл: 0,047063 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола и доводят до метки метанолом

753 мкг/мл: 4 мл раствора 1882,5 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки водой очищенной

125,5 мкг/мл: к 1 мл раствора 753 мкг/мл добавляют 5 мл мочи

100,4 мкг/мл: к 1 мл раствора 753 мкг/мл добавляют 6,5 мл мочи

83,30 мкг/мл: к 1 мл раствора 753 мкг/мл добавляют 8 мл мочи

50,20 мкг/мл: к 1 мл раствора 100,40 мкг/мл добавляют 1 мл мочи

25,10 мкг/мл: к 1 мл раствора 100,40 мкг/мл добавляют 3 мл мочи

7,79 мкг/мл: к 1 мл раствора 25,10 мкг/мл добавляют 4,5 мл мочи

2,09 мкг/мл: к 0,5 мл раствора 25,10 мкг/мл добавляют 5,5 мл мочи

0,69 мкг/мл: к 1 мл раствора 2,09 мкг/мл добавляют 2 мл мочи

## 2. Определение правильности и прецизионности

3137,5 мкг/мл: 0,07844 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола и доводят до метки метанолом

313,75 мкг/мл: 1 мл раствора 3137,5 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки водой очищенной

111,56 мкг/мл: к 5 мл раствора 313,75 мкг/мл добавляют 9 мл мочи

62,75 мкг/мл: к 2 мл раствора 313,75 мкг/мл добавляют 8 мл мочи

16,80 мкг/мл: к 5 мл раствора 62,75 мкг/мл добавляют 13,5 мл мочи

3,36 мкг/мл: к 1 мл раствора 16,80 мкг/мл добавляют 4 мл мочи

0,56 мкг/мл: к 1 мл раствора 3,36 мкг/мл добавляют 5 мл мочи

## 3. Определение ПКО и ПО

0,5 мкг/мл: к 1 мл раствора 2 мкг/мл добавляют 3 мл мочи

0,2 мкг/мл: к 1 мл раствора 2 мкг/мл добавляют 9 мл мочи

## **Приготовление стандартных растворов фенотропила:**

200 мкг/мл (исходный раствор): около 0,01 г субстанции фенотропила (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл метанола и доводят до метки метанолом.

Рабочие растворы с необходимыми концентрациями готовят путем разбавления исходного раствора водой очищенной.

40 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу на 25 мл и доводят водой очищенной до метки.

20 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу на 50 мл и доводят водой очищенной до метки.

Исходные стандартные растворы хранили при температуре 5°C (холодильник), рабочие стандартные растворы использовали свежеприготовленными.

**Приготовление модельных смесей плазмы крови и фенотропила:**

20 мкг/мл: к 2 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 2 мл плазмы крови.

5 мкг/мл: к 1 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 7 мл плазмы крови.

**Приготовление стандартных растворов парацетама:**

200 мкг/мл (исходный раствор): около 0,01 г субстанции парацетама (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл метанола и доводят до метки метанолом.

Рабочие растворы с необходимыми концентрациями готовят путем разбавления исходного раствора водой очищенной.

40 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу вместимостью 25 мл и доводят водой очищенной до метки.

20 мкг/мл: 5 мл раствора 200 мкг/мл помещают в колбу вместимостью 50 мл и доводят водой очищенной до метки.

Исходные стандартные растворы хранили при температуре 5°C (холодильник), рабочие стандартные растворы использовали свежеприготовленными.

**Приготовление модельных смесей плазмы крови и парацетама:**

20 мкг/мл: к 2 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 2 мл плазмы крови.

5 мкг/мл: к 1 мл раствора 40 мкг/мл добавляют 7 мл плазмы крови.

**Приготовление модельных смесей внутренних органов:**

К 10 г измельченного биологического объекта добавляли 1 мг исследуемого вещества и 2 мл воды и оставляли при комнатной температуре на 12 ч.

## 2.2. Реактивы и растворители

Реактивы и растворители, используемые при разработке методик и для проведения анализа, описаны в соответствующих фармакопейных статьях в ГФ XIII, Том 1 [17].

- ацетонитрил [75-05- 8]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- калия дигидрофосфат [7778-77-0]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- фосфорная кислота концентрированная. Кислота ортофосфорная концентрированная. [7664-38-2]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- борная кислота [10043-35-3]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.1;
- уксусная кислота безводная [64-19-7]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- натрия гидроокись [1310-73-2]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- трихлоруксусная кислота. [76-03-9]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15
- хлорная кислота [7601-90-3]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- хлористоводородная кислота 25% ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- хлористоводородная кислота разведенная 8,3% ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- бутанол [71-36-3]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- эфир [60-29-7]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- хлороформ [67-66-3]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15;
- этилацетат [141-78-6]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15.
- гексан [110-54-3]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15
- метанол [67-56-1]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001.15;
- петролейный эфир [8032-32-4]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15;
- натрия сульфат безводный [7757-82-6]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15;

- щавелевая кислота [6153-56-6]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15;
- этанол [64-17-5]. ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15;
- универсальная индикаторная бумага рН 0-12;
- 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты, ГФ XIII, Том 1, Титрованные растворы ОФС 1.3.0002.15.

Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 3) (ГФ XIII, ОФС.1.3.0003.15 Буферные растворы):

3,40 г калия дигидрофосфата растворяют в 900 мл воды. Доводят рН до 3,0 потенциметрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 7) (ГФ XIII, ОФС.1.3.0003.15 Буферные растворы):

250,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают со 148,2 мл 8 г/л раствора натрия гидроксида. Если необходимо, доводят рН до 7,0 потенциметрически исходным раствором калия дигидрофосфата или натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Приготовление универсальной буферной смеси Бриттона-Робинсона [32]:

Готовятся растворы 0,04 М фосфорной кислоты, 0,04 М уксусной кислоты и 0,04 М борной кислоты. Для получения буферного раствора с заданным значением рН к 100 мл полученной смеси приливают определенное количество раствора 0,2 М натрия гидроксида, указанное в таблице 2.2.1.

**Таблица 2.2.1 - Приготовление универсальной буферной смеси Бриттона-Робинсона**

рН	Количество 0,2М NaOH, мл	рН	Количество 0,2М NaOH, мл	рН	Количество 0,2М NaOH, мл
1,81	0	5,72	40,0	9,15	70,0
2,21	10,0	6,09	42,5	9,91	77,5
2,87	17,5	6,59	47,5	10,38	80,0
3,78	22,5	7,00	52,5	11,20	85,0
4,56	30,0	7,54	57,5	11,70	92,5
5,02	35,0	8,36	62,5	11,98	100

Все растворы, используемые как компоненты подвижной фазы, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и дегазировали на УЗ-бане в течение 10 мин.

### 2.3. Оборудование

- жидкостный хроматограф «LC-20 Prominence» (Shimadzu), снабженный колонкой из нержавеющей стали (250×4,6 мм) с обращенной фазой C18 «Luna 5μ C18(2) 100A и диодноматричным детектором;
- жидкостный хроматограф «LCMS - 8050» (Shimadzu), снабженный колонкой из нержавеющей стали (150\*3,0 мм, Luna 3μC18(2) 100A) с обращенно - фазным сорбентом и масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);
- иономер И-130 М;
- весы аналитические ВЛР-200;
- цифровая ультразвуковая баня CD-4820;
- центрифуга лабораторная медицинская CM-50;
- лабораторная система для вакуумной фильтрации Sartorius stedium;
- перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-04;

- шейкер лабораторный LAB Dancer;
- система очистки воды SimplicityUV;
- установка для твердофазной экстракции с вакуумной камерой на 10 позиций VACMASTER™;
- картриджи для твердофазной экстракции Strata C18-E (55um, 70A) 200 mg/3ml (Phenomenex);
- виалы хроматографические вместимостью 2 мл, с завинчивающейся крышкой и септой PTFE/Sil;
- дозатор механический Sartorius Proline 100-1000 мкл;
- мембранные шприцевые нейлоновые фильтры «Agilent Technologies» с размером пор 0,45 мкм;
- бумага фильтровальная лабораторная, ГОСТ 12026-76;
- чашки выпарительные фарфоровые вместимостью 25 мл, ГОСТ 9147-80;
- колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 мл, ГОСТ 29227-91;
- цилиндры мерные вместимостью 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74;
- пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 и 2 мл.

## 2.4. Методы исследования

### Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Анализ полученных извлечений проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием детекторов двух видов (ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС) согласно ГФ XIII, Том 1, Высокоэффективная жидкостная хроматография ОФС.1.2.1.2.0005.15.

**ВЭЖХ-УФ.** Анализ проводили на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором, снабженным колонкой из нержавеющей стали (250\*4,6 мм, Luna 5uC18(2) 100A).

**ВЭЖХ – МС/МС.** Анализ проводили на жидкостном хроматографе «LCMS - 8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной

квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). ГФ XIII, Том 1, Масс-спектрометрия ОФС.1.2.0008.15

Разделение осуществляли на хроматографической колонке из нержавеющей стали (150 \*3,0 мм, Luna 3uC18(2) 100A) с обращенно - фазным сорбентом.

#### Потенциометрическое определение рН

Потенциометрическое определение рН буферных растворов проводили согласно ГФ XIII, Том 1, Ионметрия ОФС.1.2.1.0004.15 на приборе “Иономер И-130 М”. В качестве индикаторного электрода использовали стеклянный, а электрода сравнения - хлорсеребряный.

Статистическую обработку полученных данных проводили помощью программного обеспечения Excel 2010 в соответствии с ГФ XIII, Том 1, ОФС.1.1.0013.15., расчет фармакокинетических параметров - с использованием пакета SPSS Statistics 19.0.

### **ГЛАВА 3. ВЫБОР УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОН-1 МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

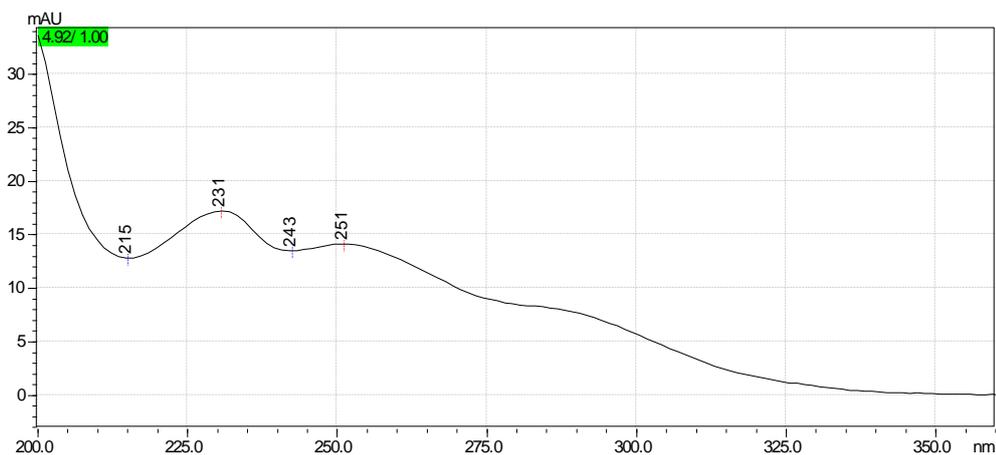
Эксперимент по выбору оптимальных условий определения КОН-1 методом обращено-фазной ВЭЖХ проводили на хроматографической колонке «Luna 3uC18(2) 100A» (Phenomenex) при температуре 40°C в режиме изократического элюирования. В качестве объекта исследования был использован стандартный раствор КОН-1 с концентрацией 10 мкг/мл (Глава 2).

В качестве элюентов были апробированы водно-ацетонитрильные смеси и водно-ацетонитрильные смеси с добавлением модификаторов (кислот, солей). Соотношения компонентов элюентов варьировались.

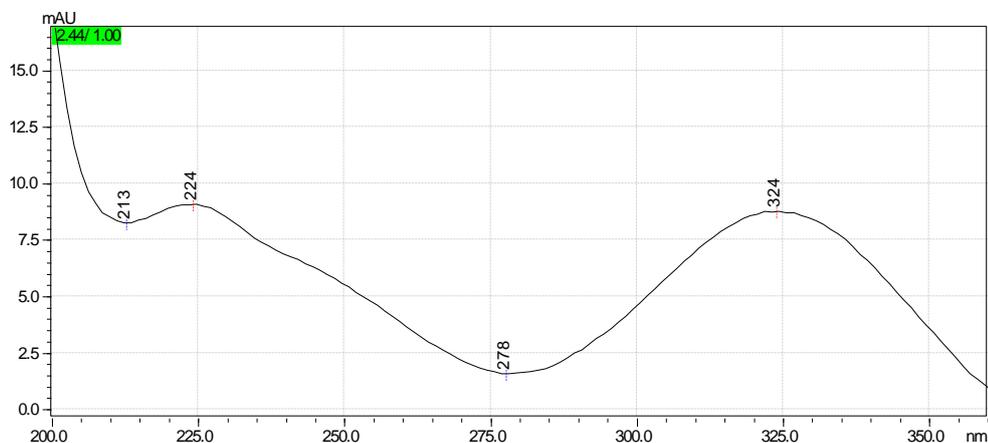
Ранее проведенные исследования по выбору условий определения посторонних примесей в субстанции КОН-1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии показали, что на характер поглощения соединения при спектрофотометрическом детектировании оказывает влияние значение реакции среды подвижной фазы [13, 22]. 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 (рис. 3.1 – 3.2).

Этот факт обусловил выбор аналитических длин волн детектирования: 230 нм для работы с использованием «кислых» элюентов и 324 нм – для работы с «нейтральными».

Установлено, что при содержании органической фазы в водно-ацетонитрильном элюенте более 30% КОН-1 слабо удерживается обращено-фазным сорбентом и имеет время удерживания (менее 3 минут), близкое ко времени удерживания несорбируемого компонента.



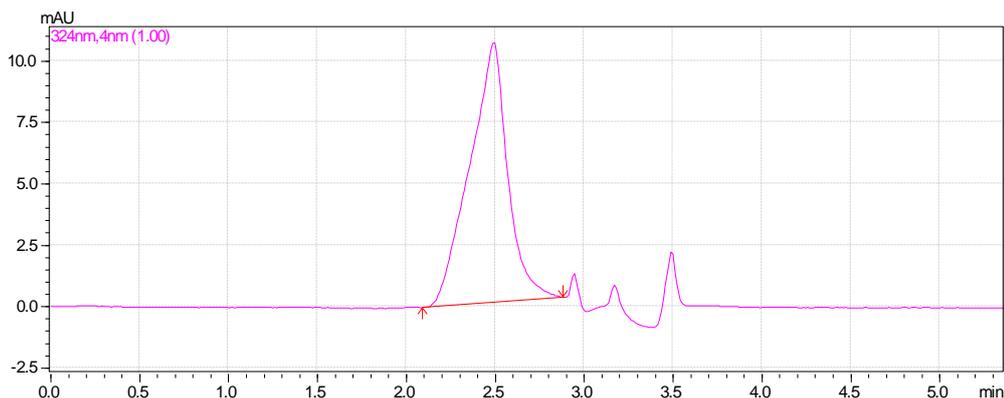
**Рисунок 3.1 – УФ-спектр стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: раствор 0,1% ТФУК – ацетонитрил (40:60)**



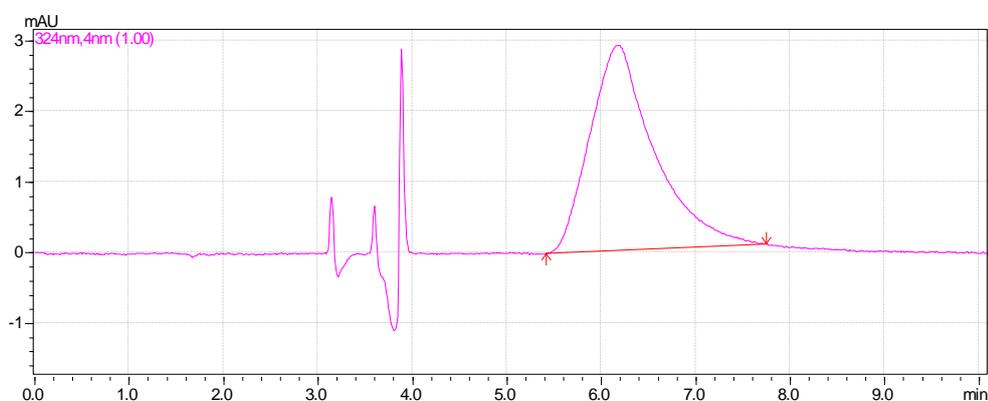
**Рисунок 3.2 – УФ-спектр стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: вода – ацетонитрил (85:15)**

На рис. 3.3 приведен пример хроматограммы, полученной при использовании подвижной фазы состава вода – ацетонитрил в соотношении 70:30.

При уменьшении доли ацетонитрила в элюенте до 15% время удерживания КОН-1 увеличивается до 6,2 мин, однако пик вещества имеет уширенную и ассиметричную форму, что свидетельствует о низкой эффективности хроматографического разделения (рис. 3.4).



**Рисунок 3.3 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: вода – ацетонитрил (70:30)**

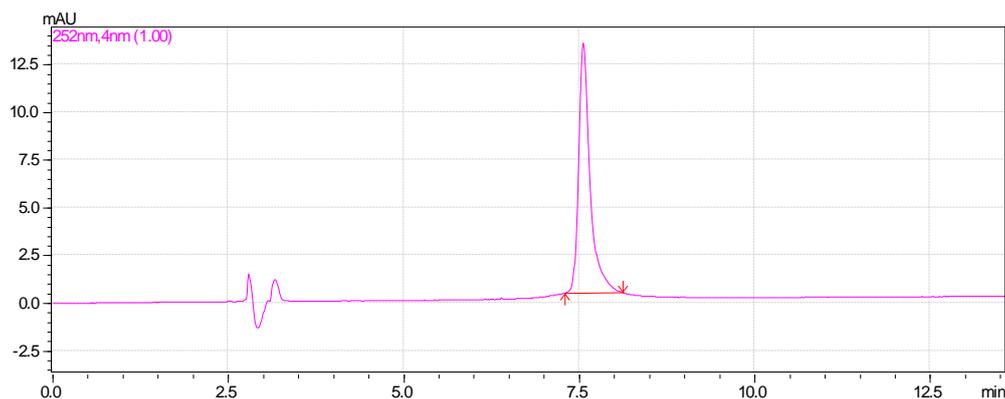


**Рисунок 3.4 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: вода – ацетонитрил (85:15)**

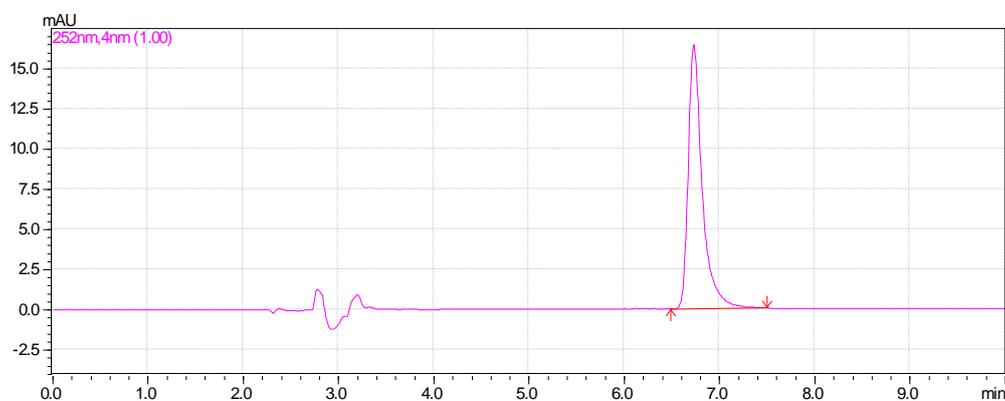
С целью достижения оптимальных характеристик эффективности и селективности разделения нами были опробованы подвижные фазы с добавлением модификаторов: 0,1% раствора трифторуксусной кислоты (ТФУК) и фосфатных буферов со значениями pH 3 и 7 (таблица 3.1).

При использовании «кислых» элюентов состава ацетонитрил – 0,1% раствор ТФУК и ацетонитрил – фосфатный буфер (pH3) было отмечено значительное улучшение удерживания КОН-1, за счет его перехода в молекулярную форму. Приемлемые факторы удерживания вещества  $k'$  (более 1,5) были получены при содержании ацетонитрила на уровне 50%.

Оптимальные хроматографические характеристики КОН-1 были достигнуты при использовании подвижных фаз ацетонитрил - 0,1% раствор ТФУК и ацетонитрил - фосфатный буфер (рН 3) при соотношениях 40:60 (рис. 3.5 – 3.6). При этом время удерживания аналита составило 7,5 мин и 6,7 мин., соответственно. Эффективность колонки в обоих случаях превышала 10 тысяч теоретических тарелок.



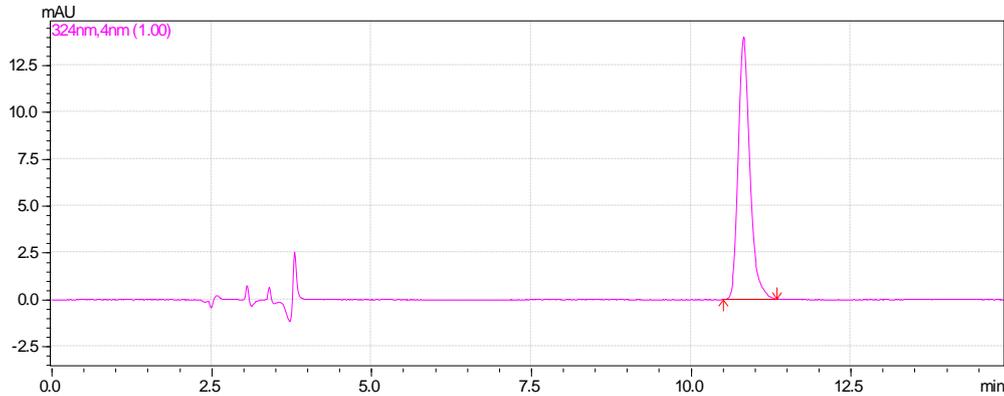
**Рисунок 3.5 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: ацетонитрил – 0,1% ТФУК, 40:60**



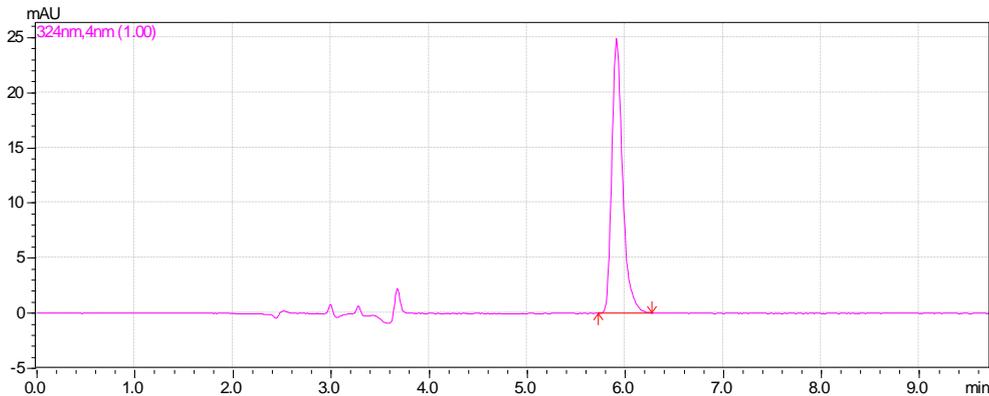
**Рисунок 3.6 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: ацетонитрил – фосфатный буфер (рН3), 40:60**

При использовании элюентов на основе ацетонитрила и фосфатного буфера с рН 7 приемлемое удерживание КОН-1 ( $k' > 1,5$ ) обеспечивалось при содержании органической фазы менее 30 % (таблица 3.1). Анализ полученных хроматограмм показал, что КОН-1 в данной системе растворителей во всех апробированных соотношениях компонентов элюируется 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). Кроме того, используемая длина волны детектирования 324 нм обеспечивала и максимальный отклик (площадь хроматографического пика) аналита (таблица 3.1). Примеры хроматограмм приведены на рис. 3.7 – 3.8.



**Рисунок 3.7 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) 20:80**



**Рисунок 3.8 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)  
Элюент: ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) 25:75**

**Таблица 3.1 - 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

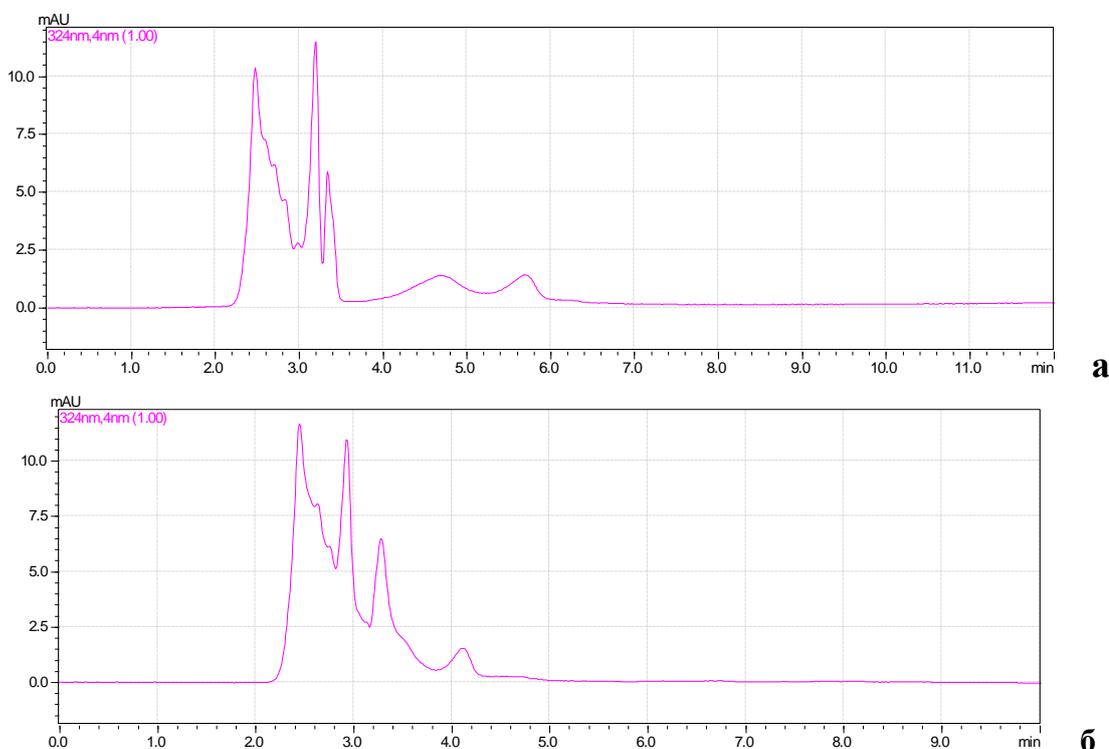
Таким образом, по результатам проведенного эксперимента установлено, что оптимальной подвижной фазой, обеспечивающей максимальную эффективность хроматографической системы и чувствительность определения КОН-1, является смесь ацетонитрил – фосфатный буфер (pH 7).

Для оценки селективности предложенных условий были проанализированы извлечения из интактных биологических жидкостей: плазмы крови и мочи.

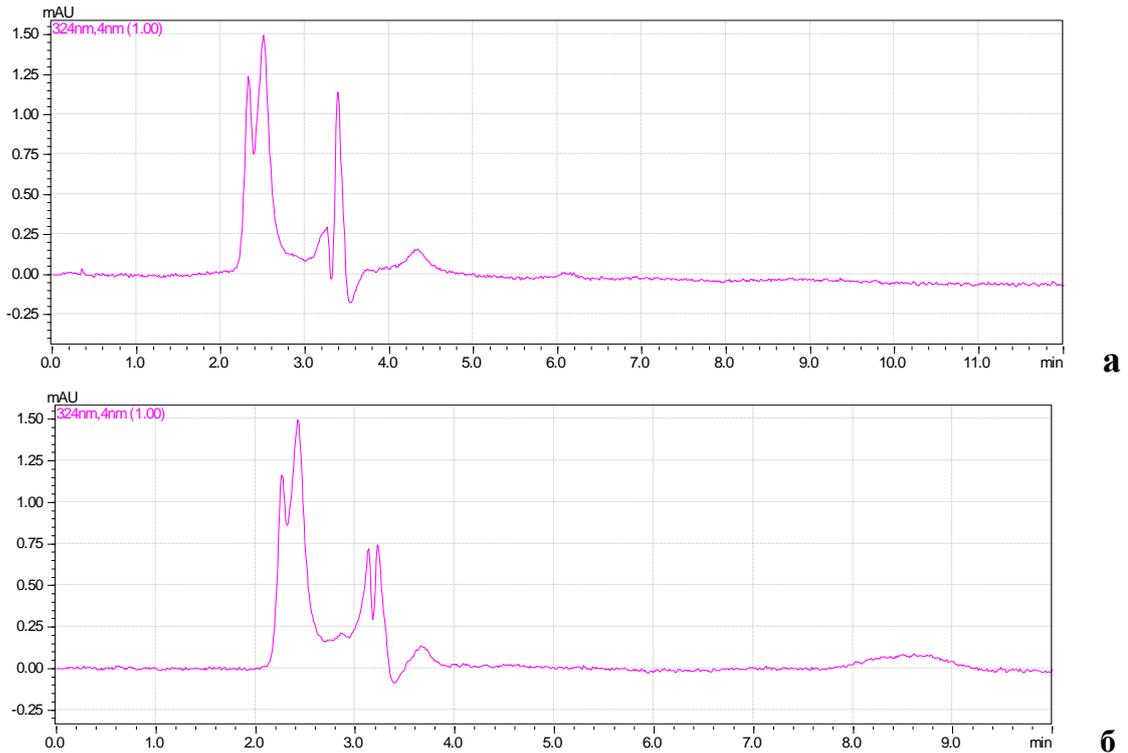
Для получения извлечения из плазмы применяли минимальную пробоподготовку, основанную на прямом осаждении белков ацетонитрилом. Для этого: в пробирку типа Эппендорф помещали 250 мкл плазмы и 250 мкл ацетонитрила. Содержимое пробирки перемешивали на лабораторном шейкере в течение 5 минут при 1500 об/мин, далее центрифугировали в течение 5 минут при 10000 об/мин. Супернатант исследовали методом ВЭЖХ.

Мочу разбавляли трехкратным количеством ацетонитрила, фильтровали через нейлоновый фильтр и исследовали методом ВЭЖХ.

Были исследованы 2 варианта подвижных фаз с содержанием ацетонитрила 20 и 25 %. Хроматограммы извлечений представлены на рис. 3.9 и 3.10.



**Рисунок 3.9 – Хроматограммы извлечений из «холостых» образцов мочи**  
**а – элюент ацетонитрил – фосфатный буфер (pH 7) 20:80**  
**б – элюент ацетонитрил – фосфатный буфер (pH 7) 25:75**



**Рисунок 3.10 – Хроматограммы извлечений из «холостых» образцов плазмы крови**

**а – элюент ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) 20:80**

**б – элюент ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) 25:75**

Установлено, что на всех «холостых» хроматограммах отсутствуют пики эндогенных веществ, совпадающие по времени удерживания с КОН-1 (5,84; 10,81 мин).

Для дальнейших исследований предпочтение было отдано элюенту ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) с соотношением 25:75, использование которого повышает экспрессность анализа.

Таким образом, нами 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.

### ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Изучены условия хроматографического разделения КОН-1 в обращенно-фазном варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием подвижных фаз на основе ацетонитрила.
2. Неудовлетворительное удерживание КОН-1 на обращенно-фазном сорбенте при использовании водно-ацетонитрильных элюентов потребовало введение в состав подвижной фазы модификаторов.
3. Применение «кислых» элюентов (на основе 0,1 % раствора трифторуксусной кислоты и фосфатного буфера с рН3) привело к увеличению удерживания анализируемого вещества на сорбенте и улучшило симметрию его хроматографических пиков.
4. Использование подвижной фазы состава ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) обеспечило максимальную эффективность хроматографической системы и чувствительность определения КОН-1. При оптимальном соотношении компонентов фазы 25:75 изучаемое соединение элюируется в виде симметричного пика со временем удерживания 5,84.
5. Спектрофотометрическое детектирование при длине волны 324 нм в разработанных хроматографических условиях обеспечивает высокую селективность определения КОН-1 в извлечениях из плазмы крови и мочи.

*Результаты проведенных исследований (Глава 3) отражены в публикации:*

1. 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.

## **ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КОИ-1**

Согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [44] основным видом биоматериала при фармакокинетических исследованиях является кровь. Также в комплекс исследуемых объектов должны входить ткани, различающиеся по степени васкуляризации, и органы, обеспечивающие элиминацию изучаемого биологически активного соединения, и экскреты.

### **4.1. Изучение условий изолирования КОИ-1 из плазмы крови методом прямого осаждения**

Осаждение белков – наиболее универсальный и простой способ подготовки плазмы крови при проведении фармакокинетических исследований. В качестве осадителей были апробированы следующие денатурирующие белок агенты: ацетонитрил, метанол, 50% раствор трихлоруксусной кислоты и 12% раствор хлорной кислоты.

Объектами исследования служили модельные смеси плазмы крови с концентрацией исследуемого вещества 2, 5 и 10 мкг/мл (приготовление модельных смесей описано в Главе 2).

Пробоподготовку плазмы крови осуществляли следующим образом: в пробирку типа Эппендорф помещали 500 мкл плазмы и добавляли определенное количество денатурирующего агента (500 мкл – ацетонитрил, метанол; 200 мкл – раствор трихлоруксусной кислоты 50%, раствор хлорной кислоты 12%). Содержимое пробирки перемешивали на лабораторном шейкере в течение 5 мин при 1500 об/мин, далее центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли, фильтровали через шприцевой нейлоновый фильтр и исследовали методом ВЭЖХ.

Каждый вариант пробоподготовки осуществлялся в шести повторностях.

При использовании в качестве осадителей ацетонитрила и растворов кислот в указанных соотношениях образовывались плотные осадки с прозрачным супернатантом.

Использование метанола в соотношении 1:1 к объему плазмы привело к образованию мутной надосадочной жидкости, что затруднило процесс фильтрования и последующего анализа. Однако увеличение количества метанола при пробоподготовке (соотношение 1:2) позволило более эффективно осадить белки плазмы и получить прозрачный супернатант, который легко фильтровался через шприцевые фильтры. Полученные результаты об эффективности извлечения КОН-1 из плазмы крови отражены в таблице 4.1.1.

**Таблица 4.1.1 – Эффективность изолирования КОН-1 из модельных смесей плазмы крови методом осаждения**

Осадитель	Соотношение <i>плазма крови / осадитель</i>	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n = 6)
1	2	3	4	5
Ацетонитрил	1:1	2,11	78,48 79,15 81,21 79,83 78,16 80,07	$X_{cp.} = 79,48$ $SD = 1,12$ $RSD = 1,41$
	1:1	5,22	80,68 81,25 79,16 80,74 77,69 80,99	$X_{cp.} = 80,09$ $SD = 1,38$ $RSD = 1,73$
	1:1	10,44	80,15 82,89 81,93 83,77 78,61 81,48	$X_{cp.} = 81,47$ $SD = 1,87$ $RSD = 2,30$

1	2	3	4	5
Метанол	1:2	2,11	93,17 95,91 92,65 90,23 91,46 92,84	$X_{cp.} = 92,71$ $SD = 1,91$ $RSD = 2,06$
	1:2	5,22	96,29 92,38 92,55 96,07 93,26 94,42	$X_{cp.} = 94,16$ $SD = 1,72$ $RSD = 1,83$
	1:2	10,44	95,18 97,22 93,64 96,87 97,59 95,98	$X_{cp.} = 96,08$ $SD = 1,48$ $RSD = 1,54$
Раствор трихлоруксус ной кислоты 50%	2:1	2,11	29,54 30,87 28,66 31,01 29,35 30,59	$X_{cp.} = 30,00$ $SD = 0,95$ $RSD = 3,18$
	2:1	5,22	33,29 30,82 32,54 30,97 31,62 32,79	$X_{cp.} = 32,01$ $SD = 1,01$ $RSD = 3,18$
	2:1	10,44	32,95 33,17 28,91 32,57 31,85 33,69	$X_{cp.} = 32,19$ $SD = 1,72$ $RSD = 5,35$
Раствор хлорной кислоты 12%	2:1	2,11	52,49 53,98 50,62 53,25 54,76 53,89	$X_{cp.} = 53,17$ $SD = 1,46$ $RSD = 2,75$

1	2	3	4	5
	2:1	5,22	54,88 52,94 51,92 53,67 52,13 55,01	$X_{cp.} = 53,43$ $SD = 1,33$ $RSD = 2,49$
	2:1	10,44	54,95 51,32 56,61 51,89 56,64 55,77	$X_{cp.} = 54,53$ $SD = 2,36$ $RSD = 4,32$

Анализ полученных извлечений 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 метанола (более 90%), который и был выбран в качестве осадителя для дальнейших исследований.

По результатам проведенного эксперимента предложена следующая методика пробоподготовки плазмы крови к хроматографическому исследованию методом 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 мин и центрифугируют 5 мин при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм и исследуют методом ВЭЖХ.

## **4.2. Использование метода жидкость-жидкостной экстракции для изолирования КОН-1 из биологических жидкостей**

### **4.2.1. Изучение процесса экстракции КОН-1 из водных растворов**

С целью разработки методики изолирования КОН-1 из биологических жидкостей было предварительно изучено влияние рН среды, природы органического растворителя и кратности экстракции на степень извлечения вещества из стандартных водных растворов.

Для создания определенного значения рН среды были приготовлены универсальные буферные смеси Бриттона-Робинсона со значениями рН в диапазоне от 2 до 11 (Глава 2).

В качестве экстрагентов были апробированы следующие органические растворители: эфир диэтиловый, эфир петролейный, этилацетат, хлороформ, гексан, бутанол.

Эксперимент проводили на стандартном водном растворе КОН-1 с концентрацией 10 мкг/мл (Глава 2).

Методика эксперимента: 1 мл водного раствора КОН-1 (10 мкг/мл) помещали в центрифужную пробирку, добавляли 1 мл универсальной буферной смеси Бриттона-Робинсона с определенным значением рН и 1 мл экстрагента. Проводили однократную экстракцию в течение 5 мин на лабораторном шейкере. Разделение органической и водной фаз осуществляли путем центрифугирования при 5 000 об/мин в течение 5 мин. Слой экстрагента отделяли, упаривали в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяли в 1 мл метанола. Полученное извлечение исследовали методом ВЭЖХ в разработанных условиях (Глава 3). Количественное определение проводили по площади пика, используя метод внешнего стандарта.

Полученные результаты показали, что гексан и петролейный эфир незначительно извлекают КОН-1 из водных растворов (менее 0,5%). Наибольшая степень извлечения КОН-1 (более 93%) наблюдается при использовании хлороформа и этилацетата при значениях рН 2-3 (рис. 4.2.1.1, таблица 4.2.1.1). Этот факт объясняется полным переходом КОН-1 в хорошо растворимую в

органических растворителях молекулярную форму и согласуется с величиной  $pK_a$  вещества [26].

Высокий процент экстракции КОН-1 из водных растворов бутанолом (более 76%) наблюдается во всем изученном диапазоне значений  $pH$  среды, что связано со способностью более полярного растворителя (в сравнении с изучаемыми) извлекать вещество, как в молекулярной форме, так и в ионизированной форме.

В связи с этим в качестве экстрагентов нами были апробированы смеси хлороформа и бутанола в отношениях 1:1 и 9:1. При этом была достигнута максимальная степень экстракции КОН-1 из водных растворов при  $pH$  2-3 (более 99 %) (таблица 4.2.1.1).

**Таблица 4.2.1.1 - Результаты однократной экстракции КОН-1 органическими растворителями в зависимости рН среды водных растворов**

Экстрагент	Степень извлечения КОН-1, % (n=3)									
	<i>pH 2</i>	<i>pH 3</i>	<i>pH 4</i>	<i>pH 5</i>	<i>pH 6</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 8</i>	<i>pH 9</i>	<i>pH 10</i>	<i>pH 11</i>
Этилацетат	92,63	93,50	85,67	21,55	0,97	1,18	0,71	0,77	0,58	0,57
Хлороформ	96,51	95,81	91,03	29,12	1,69	0,84	1,02	0,81	0,87	1,12
Гексан	0,41	0,49	0,36	0,36	0,37	0,34	0,39	0,36	0,37	0,37
Петролейный эфир	0,49	0,29	0,28	0,31	0,31	0,28	0,29	0,28	0,30	0,38
Диэтиловый эфир	67,69	61,06	25,44	3,95	0,46	0,31	0,30	0,33	0,26	0,29
Бутанол	85,51	87,79	86,00	77,21	78,02	76,93	78,34	77,28	78,12	76,64
Хлороформ-бутанол (1:1)	99,43	100,74	94,97	84,95	11,99	9,38	6,53	5,81	6,10	5,20
Хлороформ-бутанол (9:1)	97,19	99,04	94,95	70,52	3,67	2,16	1,09	1,25	1,58	1,44

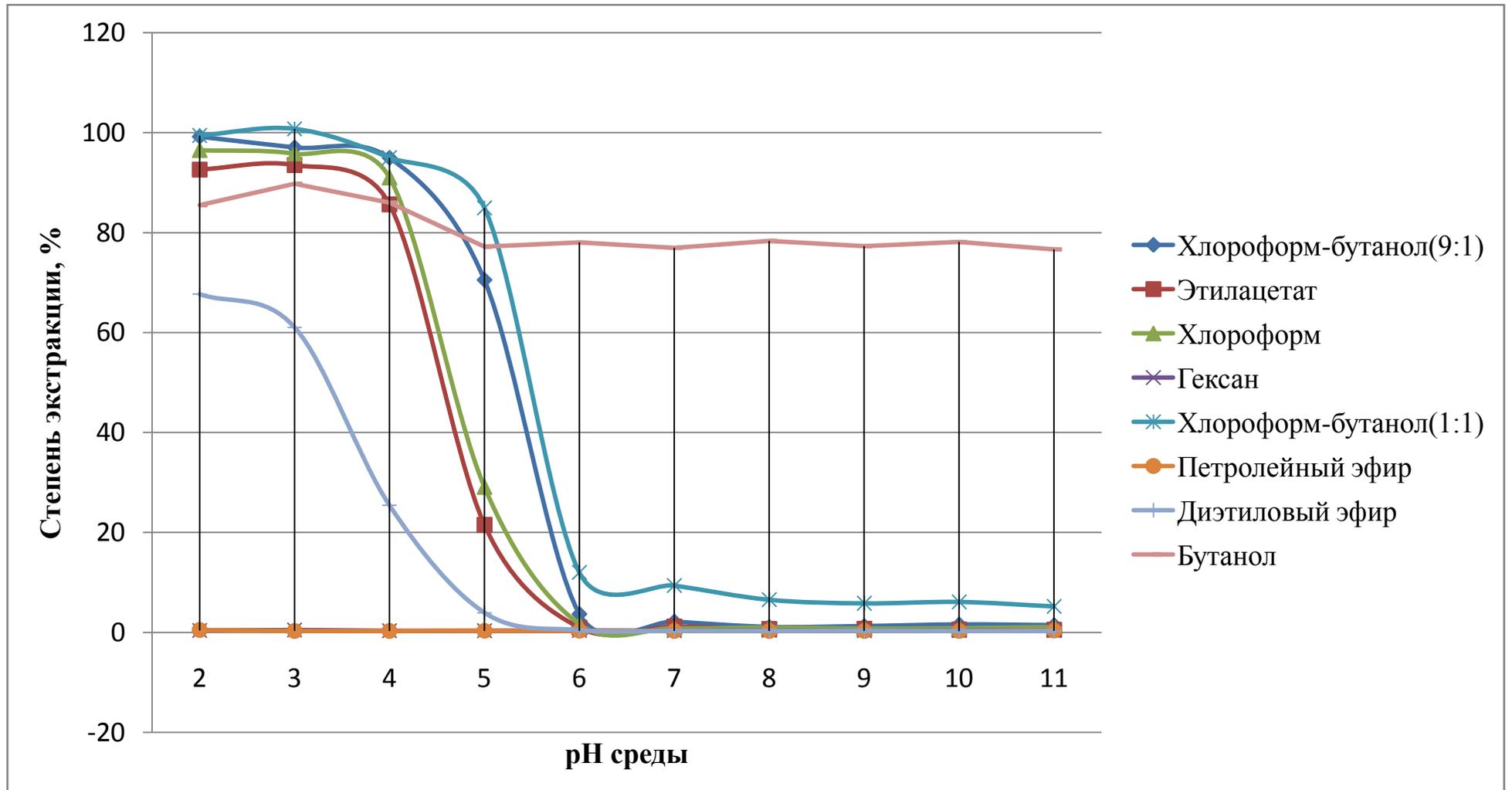


Рисунок 4.2.1.1 - Зависимость экстракции КОН-1 от рН среды водного раствора и природы экстрагента

#### 4.2.2. Разработка методики изолирования КОН-1 из плазмы крови

При изучении экстракции КОН-1 из плазмы крови в качестве экстрагентов были выбраны органические растворители, показавшие наибольшую эффективность на водных растворах вещества: хлороформ и смеси хлороформ-бутанол в соотношениях 1:1 и 9:1.

Разработка методики осуществлялась на модельных смесях плазмы крови с концентрацией КОН-1 2, 5 и 10 мкг/мл (Глава 2).

Так как изучение фармакокинетики на лабораторных животных предусматривает малые объемы отбираемых образцов плазмы (0,5 – 1 мл), дальнейшие исследования нами проводились с использованием метода микроэкстракции. Было установлено, что добавление 50 мкл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3% к 1 мл плазмы крови обеспечивает необходимое значение рН среды (рН 3).

Извлечение КОН-1 из модельных смесей осуществляли по следующей методике:

1 мл модельной смеси помещали в пробирку типа Эппендорф, подкисляли 50 мкл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3% и добавляли 1 мл экстрагента. Проводили однократную экстракцию в течение 5 мин. Органическую и водную фазы разделяли путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 5 мин, слой экстрагента отделяли, упаривали в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяли в 0,5 мл метанола. Извлечения фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм и исследовали методом ВЭЖХ в разработанных условиях (Глава 1). Количественное определение проводили по площади пика, используя метод внешнего стандарта.

В таблице 4.2.2.1 представлены результаты, демонстрирующие наибольшую эффективность извлечения КОН-1 из плазмы смесью хлороформ - бутанол (9:1).

**Таблица 4.2.2.1 – Результаты однократной экстракции КОН-1 из модельных смесей плазмы крови**

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
1	2	3	4
хлороформ	2,01	48,03	$X_{cp.} = 48,59$ $SD = 1,80$ $RSD = 3,71$
		50,17	
		47,62	
		45,86	
		50,79	
		49,04	
	5,02	51,16	$X_{cp.} = 49,86$ $SD = 2,24$ $RSD = 4,48$
		47,91	
		50,28	
10,04	46,37	$X_{cp.} = 51,06$ $SD = 2,12$ $RSD = 4,15$	
	51,38		
	52,06		
	49,82		
	53,73		
	51,20		
48,93			
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	49,22	$X_{cp.} = 70,02$ $SD = 1,19$ $RSD = 1,69$
		53,48	
		71,09	
		69,54	
		69,91	
		68,28	
	5,02	71,60	$X_{cp.} = 73,16$ $SD = 1,11$ $RSD = 1,52$
		69,67	
		71,71	
		73,15	
		72,20	
		74,69	
	10,04	73,15	$X_{cp.} = 71,50$ $SD = 1,53$ $RSD = 2,14$
		74,08	
		72,16	
		73,91	
		70,42	
		72,14	
69,72			
70,66			

1	2	3	4
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	60,12	$X_{cp.} = 58,89$ $SD = 1,50$ $RSD = 2,54$
		59,78	
		57,36	
		57,89	
		60,74	
		57,43	
	5,02	53,43	$X_{cp.} = 54,81$ $SD = 3,00$ $RSD = 5,48$
		57,91	
		54,10	
10,04	59,04	$X_{cp.} = 56,91$ $SD = 2,10$ $RSD = 3,70$	
	51,32		
	53,08		
	56,17		
	60,94		
	55,26		
57,09			
		56,68	
		55,32	

С целью увеличения степени изолирования вещества нами была использована двукратная экстракция порциями экстрагента по 0,5 мл. Данный прием позволил повысить степень экстракции КОН-1, максимальное значение которой составило 80,86 % при использовании экстрагента хлороформ - бутанол (9:1) (таблица 4.2.2.2).

**Таблица 4.2.2.2 – Результаты двукратной экстракции КОН-1 из модельных смесей плазмы крови**

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
1	2	3	4
хлороформ	2,01	54,76	$X_{cp.} = 57,94$ $SD = 2,09$ $RSD = 3,61$
		59,08	
		56,19	
		60,45	
		58,99	
		58,14	

1	2	3	4
	5,02	60,21 57,29 54,77 55,38 54,61 55,42	$X_{cp.} = 56,28$ $SD = 2,15$ $RSD = 3,82$
	10,04	58,46 61,74 59,82 60,11 58,93 59,44	$X_{cp.} = 59,75$ $SD = 1,14$ $RSD = 1,91$
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	82,37 78,19 78,82 80,46 79,58 80,17	$X_{cp.} = 79,93$ $SD = 1,46$ $RSD = 1,83$
	5,02	76,15 79,91 82,57 80,62 83,66 82,25	$X_{cp.} = 80,86$ $SD = 2,68$ $RSD = 3,31$
	10,04	80,64 75,29 77,06 79,78 74,33 75,00	$X_{cp.} = 77,02$ $SD = 2,65$ $RSD = 3,44$
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	58,76 61,27 59,94 58,08 62,36 60,95	$X_{cp.} = 60,23$ $SD = 1,61$ $RSD = 2,68$
	5,02	66,18 62,72 62,34 59,58 61,96 59,79	$X_{cp.} = 62,10$ $SD = 2,40$ $RSD = 3,86$

1	2	3	4
	10,04	61,58 64,03 65,74 69,68 62,23 65,79	$X_{cp.} = 64,84$ $SD = 2,94$ $RSD = 4,53$

Также нами было оценено влияние разбавления плазмы крови водой на степень извлечения анализируемого вещества. Для этого модельные смеси разбавляли водой в соотношении 1:1. К 1 мл полученной смеси добавляли 50 мкл хлористоводородной кислоты разведённой 8,3% и 0,5 мл экстрагента. Пробирку встряхивали на лабораторном шейкере в течение 5 мин. Образовавшуюся эмульсию разрушали путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 5 мин. Экстракцию проводили двукратно. Органический слой переносили в выпарительную чашку, сухой остаток после удаления экстрагента в токе теплого воздуха растворяли в 0,5 мл метанола. Извлечения фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр и исследовали методом ВЭЖХ.

Полученные результаты отражены в таблице 4.2.2.3. Установлено, что разбавление плазмы крови водой приводит к увеличению степени экстракции КОН-1 в среднем на 10% при использовании всех тестируемых экстрагентов.

**Таблица 4.2.2.3 – Результаты двукратной экстракции КОН-1 из разбавленных водой модельных смесей плазмы крови**

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
1	2	3	4
хлороформ	2,01	69,46 66,87 68,37 65,95 69,47 72,84	$X_{cp.} = 68,83$ $SD = 2,42$ $RSD = 3,51$

1	2	3	4
	5,02	68,55 69,70 71,59 66,04 70,12 68,11	$X_{cp.} = 69,02$ $SD = 1,91$ $RSD = 2,76$
	10,04	73,14 70,69 71,28 69,35 72,07 68,61	$X_{cp.} = 70,86$ $SD = 1,69$ $RSD = 2,38$
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	92,48 91,67 90,53 89,04 93,46 88,22	$X_{cp.} = 90,90$ $SD = 2,02$ $RSD = 2,22$
	5,02	87,15 93,07 88,92 90,45 87,36 87,05	$X_{cp.} = 89,00$ $SD = 2,39$ $RSD = 2,69$
	10,04	95,38 91,62 93,44 89,97 94,06 93,85	$X_{cp.} = 93,05$ $SD = 1,94$ $RSD = 2,08$
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	75,81 71,09 74,38 69,54 72,66 71,25	$X_{cp.} = 72,46$ $SD = 2,32$ $RSD = 3,20$
	5,02	77,94 72,17 75,54 70,23 74,55 73,36	$X_{cp.} = 73,97$ $SD = 2,69$ $RSD = 3,64$

1	2	3	4
	10,04	75,61 76,49 73,27 72,98 75,51 76,64	$X_{cp.} = 75,08$ $SD = 1,59$ $RSD = 2,11$

Таким образом, с учетом полученных результатов были предложены условия пробоподготовки плазмы крови на основе жидкость-жидкостной экстракции, предполагающие предварительное разбавление биологической жидкости водой в соотношении 1:1 и двукратную экстракцию КОН-1 смесью хлороформ – бутанол (9:1) при рН 3.

Для этого 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.

#### 4.2.3. Разработка методики изолирования КОН-1 из мочи

Для извлечения КОН-1 из модельных смесей мочи с концентрацией вещества 2, 5 и 10 мкг/мл использовали хлороформ и смеси хлороформ-бутанол в соотношениях 1:1 и 9:1.

Пробоподготовку мочи к анализу осуществляли следующим образом: 1 мл модельной смеси помещали в центрифужную пробирку, подкисляли 50 мкл хлористоводородной кислотой разведенной 8,3 %. Проводили однократную экстракцию в течение 5 мин 1 мл органического растворителя на лабораторном шейкере. Содержимое пробирки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин для разделения водной и органической фаз. Органический слой переносили в

выпарительную чашку и испаряли в токе теплого воздуха. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл метанола, фильтровали через мембранные шприцевые нейлоновые фильтры с размером пор 0,45 мкм и исследовали методом ВЭЖХ в разработанных условиях (Глава 3). Количественное определение проводили по площади пика, используя метод внешнего стандарта. Результаты представлены в таблице 4.2.3.1.

Для увеличения степени экстракции мы применили двукратную экстракцию порциями органического растворителя по 0,5 мл. Это позволило повысить степень извлечения КОН-1 на 8-10 % (таблица 4.2.3.2).

**Таблица 4.2.3.1 - Результаты однократной экстракции КОН-1 из модельных смесей мочи**

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
1	2	3	4
хлороформ	2,01	87,15 91,24 86,39 85,78 89,05 92,56	$X_{cp.} = 88,70$ $SD = 2,75$ $RSD = 3,10$
	5,02	90,31 87,19 88,02 84,56 93,48 91,77	$X_{cp.} = 89,22$ $SD = 3,26$ $RSD = 3,65$
	10,04	87,10 94,53 91,48 86,53 88,94 89,08	$X_{cp.} = 89,61$ $SD = 2,97$ $RSD = 3,32$

1	2	3	4
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	84,26 79,45 82,39 81,17 81,58 83,04	$X_{cp.} = 81,98$ $SD = 1,66$ $RSD = 2,02$
	5,02	86,55 81,09 82,37 82,04 80,68 88,26	$X_{cp.} = 83,50$ $SD = 3,13$ $RSD = 3,75$
	10,04	85,39 86,08 82,69 83,04 79,21 87,84	$X_{cp.} = 84,04$ $SD = 3,05$ $RSD = 3,63$
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	86,91 78,69 79,28 80,50 83,46 82,67	$X_{cp.} = 81,92$ $SD = 3,07$ $RSD = 3,75$
	5,02	78,59 86,37 81,08 79,45 84,17 82,94	$X_{cp.} = 82,10$ $SD = 2,95$ $RSD = 3,60$
	10,04	83,15 83,69 81,24 85,53 80,98 86,34	$X_{cp.} = 83,49$ $SD = 2,18$ $RSD = 2,61$

**Таблица 4.2.3.2 - Результаты двукратной экстракции КОН-1 из модельных смесей мочи**

Экстрагент	Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
1	2	3	4
хлороформ	2,01	94,71 100,10 98,22 99,14 95,94 96,50	$X_{cp.} = 97,44$ $SD = 2,06$ $RSD = 2,11$
	5,02	101,50 99,99 97,68 101,12 94,87 97,09	$X_{cp.} = 98,71$ $SD = 2,59$ $RSD = 2,63$
	10,04	99,29 95,16 100,45 97,84 100,70 94,61	$X_{cp.} = 98,01$ $SD = 2,63$ $RSD = 2,68$
смесь хлороформ – бутанол (9:1)	2,01	92,14 95,61 90,08 91,92 92,34 91,70	$X_{cp.} = 92,30$ $SD = 1,81$ $RSD = 1,96$
	5,02	87,58 101,35 95,38 89,94 93,18 92,16	$X_{cp.} = 93,27$ $SD = 4,78$ $RSD = 5,13$
	10,04	89,84 95,27 99,30 91,61 85,20 94,09	$X_{cp.} = 92,55$ $SD = 4,85$ $RSD = 5,24$

1	2	3	4
смесь хлороформ – бутанол (1:1)	2,01	91,62	$X_{cp.} = 89,41$ $SD = 2,55$ $RSD = 2,86$
		89,30	
		85,79	
		90,05	
		87,22	
		92,48	
	5,02	90,76	$X_{cp.} = 91,79$ $SD = 0,81$ $RSD = 0,88$
		91,63	
		93,12	
91,55			
92,27			
10,04	91,40	$X_{cp.} = 90,96$ $SD = 2,33$ $RSD = 2,57$	
	89,25		
	92,46		
	94,31		
	87,89		
	90,07		
91,76			

Установлено, что наиболее эффективно анализируемое вещество извлекается из модельных смесей мочи хлороформом. По результатам проведенного исследования предложена следующая методика количественного определения КОН-1 в моче:

1 мл мочи подкисляют 50 мкл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3% и проводят двукратную экстракцию в течение 5 мин хлороформом порциями по 0,5 мл. Центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин, 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.

### 4.3. Изучение условий изолирования КОН-1 из плазмы крови методом твердофазной экстракции (ТФЭ)

В исследованиях сложных биологических матриц, таких как кровь и моча, широко используется обращено-фазный вариант твердофазной экстракции (ТФЭ). Патроны для ТФЭ выбирают, учитывая свойства анализируемых веществ, характер объектов исследования, а также метод анализа получаемых извлечений.

Процесс пробоподготовки осуществляли на установке для твердофазной экстракции с вакуумной камерой на 10 позиций VACMASTER™.

Для разработки методики изолирования КОН-1 были использованы картриджи для твердофазной экстракции Strata C18-E (55  $\mu$ m, 70Å) 200 mg/3ml (Phenomenex), упакованные гидрофобным сорбентом на основе силикагеля с привитой фазой C18. Выбор данных картриджей обусловлен тем, что КОН-1 удовлетворительно удерживается на обращенно-фазном сорбенте, а элюенты, используемые на этапе десорбции аналитов с патрона, совместимы с аналитическими условиями ВЭЖХ.

Эксперимент по выбору оптимальных условий ТФЭ проводили на стандартном водном растворе КОН-1 с концентрацией 5 мкг/мл.

Подготовку патронов к анализу осуществляли следующим образом:

- патрон в соответствии с инструкцией последовательно кондиционировали 1 мл метанола и 1 мл дистиллированной воды;
- через патрон пропускали 1 мл водного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) (скорость загрузки образца не превышала 1 мл/мин);
- на этапе промывки патрона с целью удаления эндогенных компонентов плазмы использовали 10% раствор метанола (1 мл) и воду дистиллированную (1 мл).

Для элюирования КОН-1 с патрона были апробированы растворители, совместимые с компонентами подвижной фазы в ВЭЖХ – метанол и ацетонитрил. Элюирование осуществляли порциями по 1 и 0,5 мл. Скорость промывки и элюирования не превышала 1 мл/мин.

Эффективность экстракции представлена в таблице 4.3.1.

**Таблица 4.3.1 – Степень извлечения КОН-1 из водного раствора (5 мкг/мл) методом твердофазной экстракции**

Элюент		Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
Метанол	1 мл	37,87 37,23 37,66 34,89 36,51 37,48	$X_{cp.} = 36,94$ $SD = 1,11$ $RSD = 3,00$
	0,5 мл	14,04 14,89 15,11 15,32 16,30 15,54	$X_{cp.} = 15,20$ $SD = 0,75$ $RSD = 4,91$
Ацетонитрил	1 мл	5,32 6,14 5,71 5,53 6,28 6,09	$X_{cp.} = 5,85$ $SD = 0,38$ $RSD = 6,53$
	0,5 мл	не обнаружено	-

Установлено, что 1 мл метанола извлекается 36,94 % аналита, около 15 % КОН-1 обнаруживается на этапе повторного элюирования. При использовании ацетонитрила КОН-1 обнаруживался в незначительном количестве только в первом извлечении.

Анализ фракций, получаемых на этапе промывки патрона, показал (таблица 4.3.2), что значительные потери вещества происходят на данной стадии.

**Таблица 4.3.2 – Анализ «промывочных» фракций**

Элюент		Содержание в промывочных фракциях, % (n=6)
Метанол	1 фракция	10,92
	2 фракция	не обнаружено
Ацетонитрил	1 фракция	9,24
	2 фракция	не обнаружено

Для снижения потерь аналита для промывки патрона использовали 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной и воду дистиллированную. Данный выбор обосновывался тем, что при пропускании «кислого» раствора через патрон происходит переход аналита, обладающего кислотными свойствами, в неионизированную (молекулярную) форму, что, в свою очередь, приводит к более сильной его сорбции на неполярном сорбенте.

После кондиционирования и загрузки патрона производили последовательную промывку 1 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной (фракция 1) и 1 мл воды дистиллированной (фракция 2). Далее сорбаты элюировали с помощью 1,5 мл метанола или 1 мл ацетонитрила и исследовали методом ВЭЖХ. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.3.3.

**Таблица 4.3.3 - Степень извлечения КОН-1 из водных растворов (5 мкг/мл) методом ТФЭ (промывка 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты и водой)**

Элюент		Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
1		2	3
Метанол	1,5 мл	81,15	X <sub>ср.</sub> = 76,41 SD = 4,48 RSD = 5,87
		72,26	
		75,30	
		82,84	
		74,02	
		72,88	

1		2	3
Ацетонитрил	1 мл	15,15 13,24 15,71 14,68 15,09 15,36	$X_{cp.} = 14,87$ $SD = 0,87$ $RSD = 5,84$

Анализ «промывочных» фракций – 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты (фракция 1) и воды (фракция 2) показал, что подкисление аналита после загрузки приводит к его полной сорбции на патроне и устранению его потерь на этапе промывки. Выход КОН-1 в данном случае при элюировании метанолом и ацетонитрилом в среднем возрастает до 76% и 15% соответственно.

Для увеличения степени извлечения КОН-1 были апробированы в качестве элюентов ацетонитрил и метанол, подщелоченные аммиаком водным до рН 10. Использование подщелоченных растворов на стадии десорбции аналита привело к увеличению степени экстракции КОН-1, что объясняется лучшей его растворимостью в полярных растворителях в ионизированной форме (таблица 4.3.4).

**Таблица 4.3.4 - Степень извлечения КОН-1 из водных растворов (5 мкг/мл) методом ТФЭ с использованием подщелоченных элюентов**

Элюент		Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
Метанол рН 10	1,5 мл	94,30 95,62 87,77 91,75 94,41 90,52	$X_{cp.} = 92,40$ $SD = 2,95$ $RSD = 3,19$
Ацетонитрил рН 10	1 мл	24,40 25,92 23,17 24,09 22,55 24,63	$X_{cp.} = 24,13$ $SD = 1,18$ $RSD = 4,89$

При разработке методики определения КОН-1 в плазме крови методом твердофазной экстракции нами были использованы условия, обеспечившие максимальное извлечение КОН-1 из водных растворов.

Эксперимент проводили на модельной смеси плазмы крови и КОН-1 с концентрацией 5 мкг/мл.

Кондиционирование осуществляли последовательной промывкой патрона 1 мл метанола и 1 мл воды. Далее пропускали через патрон 1 мл модельной смеси со скоростью 1 мл/мин.

На этапе промывки использовали 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты и воду. В качестве элюентов были апробированы метанол и метанол, подщелоченный аммиаком водным до pH 10. Полученные результаты представлены в таблице 4.3.5.

**Таблица 4.3.5 – Степень извлечения КОН-1 из модельной смеси плазмы крови (концентрация КОН-1 5 мкг/мл) методом ТФЭ**

Элюент		Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
Метанол pH 10	1,5 мл	81,06	X <sub>ср.</sub> = 83,22 SD = 2,71 RSD = 3,25
		80,86	
		87,24	
		82,69	
		85,89	
		81,55	
Метанол	1,5 мл	75,10	X <sub>ср.</sub> = 74,74 SD = 3,37 RSD = 4,51
		70,99	
		77,70	
		71,55	
		73,61	
		97,48	

Установлено, что степень экстракции КОН-1 при извлечении из плазмы крови зависит от pH среды элюента: наибольшее количество анализата (более 80%) извлекается при использовании подщелоченного метанола.

По результатам проведенных исследований нами предложена следующая схема изолирования КОН-1 из плазмы крови методом твердофазной экстракции:

- Кондиционирование патрона путем последовательного промывания 1 мл метанола и 1 мл дистиллированной воды.
- Загрузка патрона 1 мл плазмы.
- Промывка патрона с целью удаления белков и других эндогенных компонентов плазмы 1 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной и 1 мл воды дистиллированной.
- Элюирование сорбированного аналита 1 мл метанола, подщелоченного аммиаком водным до рН 10.
- Скорость пропускания модельной смеси и растворов на каждой стадии составляет 1 мл/мин.

#### **4.4. Изучение условий изолирования КОН-1 из внутренних органов**

##### **4.4.1. Апробация общих и частных методов изолирования для извлечения КОН-1**

Эксперимент проводили на модельных смесях ткани гомогенизированной печени с содержанием КОН-1 (Глава 2).

На первом этапе 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).

Изолирование по методу Васильевой осуществляли следующим образом:

10,0 г измельченного биологического объекта настаивали с 20 мл воды, подкисленной щавелевой кислотой до рН 3, в течение 2 ч. Водное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Объект промывали 3 мл воды, промывные воды присоединяли к фильтрату. Полученное извлечение переносили в делительную воронку. Далее проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из

кислых растворов хлороформом порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Хлороформное извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрия сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм («кислое» извлечение). Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Оставшееся в делительной воронке водное извлечение подщелачивали аммиаком водным до рН 9-10 и проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из щелочного раствора хлороформом порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Хлороформное извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрия сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм («щелочное извлечение»). Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Результаты определения КОН-1 в «кислой» и «щелочной» фракциях представлены в табл. 4.4.1.1.

**Таблица 4.4.1.1 – Степень извлечения КОН-1 из ткани печени  
(метод Васильевой)**

	Степень извлечения КОН-1, %	Метрологические характеристики (n=6)
«Кислая» фракция	15,97 16,89 14,42 17,10 15,09 13,22	$X_{cp.} = 15,44$ $SD = 1,50$ $RSD = 9,70$
«Щелочная» фракция	не обнаружено	

### Извлечение по методу Стаса-Отто:

10,0 г измельченного биологического объекта настаивали с 5 мл спирта этилового, подкисленной щавелевой кислотой до рН 3, в течение 2 ч (по «классической» методике - 24 ч). Спиртовое извлечение сливали в выпарительную чашку, упаривали на водяной бане до густого остатка. К остатку по каплям добавляли спирт для коагуляции белков. Осадок отфильтровывали. К остатку добавляли 10 мл горячей воды для удаления смолистых веществ, жиров и пигментов. Осадок отфильтровывали, извлечение переносили в делительную воронку. Контролировали рН среды (при необходимости подкисляли раствор до рН 2-3 щавелевой кислотой). Далее проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из кислых растворов хлороформом порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Хлороформное извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрия сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм (кислое извлечение). Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Оставшееся в делительной воронке водное извлечение подщелачивали аммиаком водным до рН 9-10 и проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из щелочного раствора хлороформом порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Хлороформное извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрия сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм (щелочное извлечение). Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Результаты определения КОН-1 в полученных фракциях представлены в табл.4.4.1.2.

**Таблица 4.4.1.2 – Степень извлечения КОН-1 из ткани печени  
(метод Стаса-Отто)**

	Степень извлечения КОН-1, %	Метрологические характеристики (n=6)
«Кислая» фракция	0,21 0,19 0,14 0,23 0,19 0,16	$X_{\text{ср.}} = 0,19$ $SD = 0,03$ $RSD = 17,50$
«Щелочная» фракция	не обнаружено	

В ходе проведенного эксперимента было установлено, что при использовании «классических» методов изолирования КОН-1 извлекается в очень малых количествах. Это связано с тем, что на первой стадии изолирования в данных методах не учитывается растворимость КОН-1 в воде (поскольку в кислой среде исследуемое вещество находится в кислотной неионизированной форме). Кроме того, многостадийная очистка, предусмотренная в методе Стаса-Отто, приводит к дополнительным потерям исследуемого вещества. В «щелочных» фракциях КОН-1 не обнаруживался.

В химико-токсикологическом анализе при частном исследовании биообъектов на наличие барбитуратов применяется метод Вало́ва, учитывающий кислотные свойства веществ и основанный на настаивании биологического объекта с водой, подщелоченной натрия гидроксидом, с последующей экстракцией эфиром диэтиловым. Поскольку КОН-1 проявляет слабые кислотные свойства, модифицированные условия данного метода были апробированы.

Для этого, к 10,0 г биологического объекта добавляли 20 мл воды и подщелачивали 20% раствором натрия гидроксида до pH 10. Производили настаивание в течение 30 мин на перемешивающем устройстве (150 об/мин). Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат помещали в делительную воронку, подкисляли кислотой хлористоводородной

25% до pH 3 по универсальному индикатору. Далее проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из кислых растворов эфиром диэтиловым порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Эфирное извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрия сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм. Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Результаты представлены в табл. 4.4.1.3.

**Таблица 4.4.1.3 – Степень извлечения КОН-1 из ткани печени  
(метод Валова)**

Степень извлечения КОН-1, %	Метрологические характеристики (n=6)
36,08	$X_{\text{ср.}} = 32,68$
32,74	$SD = 2,78$
29,67	$RSD = 8,52$
30,15	
35,91	
31,53	

Использование частной методики привело к увеличению извлечения КОН-1 из биообъекта по сравнению с «общими» методами изолирования. Но поскольку выход вещества не превышал 32%, нами были предприняты попытки оптимизировать его извлечение с учетом физико-химических свойств.

#### **4.4.2. Оптимизация методики извлечения КОН-1 из биообъектов**

Разработка методики извлечения КОН-1 проводилась с учетом растворимости вещества в полярных и неполярных растворителях на первой и второй стадиях изолирования.

На первой стадии изолирования при настаивании биологического объекта с полярным растворителем (водой или спиртом) необходимо перевести

изолируемое вещество в ионизированное состояние. На второй стадии изолирования подбираются органические растворители, которые хорошо экстрагируют исследуемое вещество в молекулярной (неионизированной) форме.

Поскольку изучаемое соединение проявляет слабые кислотные свойства за счет наличия в структуре енольной гидроксильной группы, на первой стадии изолирования были использованы полярные растворители (вода, спирт этиловый), подщелоченные аммиаком водным до pH 10. На второй стадии изолирования были использованы органические растворители, максимально извлекающие КОН-1 из кислых водных растворов (pH 3): этилацетат, хлороформ, а также смесь хлороформ – бутанол (9:1). Смесь хлороформ – бутанол (1:1) не была использована в качестве экстрагента, поскольку при большом содержании бутанола происходит длительное испарение органической фазы на этапе получения сухого остатка.

#### Изолирование водой, подщелоченной аммиаком водным:

10,0 г биологического объекта настаивали с 20 мл воды, подщелоченной аммиаком водным до pH 10 по универсальному индикатору, в течение 2 ч на перемешивающем устройстве (150 об/мин). Водное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Объект промывали 5 мл подщелоченной воды, промывные воды присоединяли к фильтрату. Полученное извлечение переносили в делительную воронку и подкисляли кислотой хлористоводородной 25 % до pH 3 по универсальному индикатору.

Далее проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из кислых растворов одним из выбранных экстрагентов (этилацетатом, хлороформом, смесью хлороформ – бутанол (9:1)) порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Органическое извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрием сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм (кислое извлечение). Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Изолирование спиртом, подщелоченным аммиаком водным:

10,0 г биологического объекта настаивали с 20 мл спирта этилового (75%), подщелоченного аммиаком водным до рН 9-10 универсальному индикатору, в течение 2 ч на перемешивающем устройстве (150 об/мин). Спиртовое извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Объект промывали 5 мл подщелоченного спирта, промывные воды присоединяли к фильтрату. Полученное извлечение переносили в делительную воронку и подкисляли кислотой хлористоводородной 25 % до рН 3 по универсальному индикатору.

Далее проводили трехкратную экстракцию КОН-1 из кислых растворов одним из выбранных экстрагентов (этилацетатом, хлороформом, смесью хлороформ – бутанол (9:1)) порциями по 3 мл. Время каждой экстракции – 2 мин. Хлороформное извлечение фильтровали через фильтр с безводным натрия сульфатом и переносили в выпарительную чашку. Сухой остаток после испарения органического растворителя растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы «Agilent Technologies» (США) с размером пор 0,45 мкм (кислое извлечение). Извлечение исследовали методом ВЭЖХ.

Результаты исследований представлены в табл. 4.4.2.1 – 4.4.2.2.

**Таблица 4.4.2.1 – Результаты извлечения КОН-1 из ткани печени «подщелоченной» водой**

Экстрагент	Степень извлечения КОН-1, %	Метрологические характеристики (n=6)
1	2	3
Этилацетат	40,13 34,04 37,50 42,18 35,52 33,11	$X_{cp.} = 37,08$ $SD = 3,07$ $RSD = 8,29$

1	2	3
Хлороформ	44,62 49,63 41,34 44,41 47,38 42,70	$X_{cp.} = 45,01$ $SD = 2,86$ $RSD = 6,36$
Хлороформ – бутанол (9:1)	55,73 46,48 48,42 49,03 51,11 54,40	$X_{cp.} = 50,86$ $SD = 3,23$ $RSD = 6,36$

**Таблица 4.4.2.2 – Результаты извлечения КОН-1 из ткани печени  
«подщелоченным» спиртом**

Экстрагент	Степень извлечения КОН-1, %	Метрологические характеристики (n=6)
Этилацетат	35,12 32,96 30,47 35,67 29,56 35,87	$X_{cp.} = 33,28;$ $SD = 2,49$ $RSD = 7,47$
Хлороформ	36,44 39,46 34,71 33,73 36,15 38,81	$X_{cp.} = 36,55$ $SD = 2,00$ $RSD = 5,47$
Хлороформ – бутанол (9:1)	46,66 40,81 44,17 42,58 39,57 43,87	$X_{cp.} = 42,94$ $SD = 2,51$ $RSD = 5,83$

Установлено, что максимальное извлечение КОН-1 из ткани печени наблюдается при использовании на первой стадии воды, подщелоченной до рН 10, на второй стадии – экстрагента хлороформ-бутанол (9:1).

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Предложена экспрессная методика пробоподготовки плазмы крови к хроматографическому определению КОН-1 методом прямого осаждения белков плазмы крови метанолом в соотношении 1:2. Процент извлечения КОН-1 из модельных смесей плазмы крови составил 92,71 – 96,06 % в зависимости концентрации.
2. С целью разработки методик изолирования КОН-1 из биологических жидкостей на основе жидкость-жидкостной экстракции было изучено влияние рН среды, природы органического растворителя и кратности экстракции на степень извлечения КОН-1 из водных растворов. Установлено, что наиболее эффективно КОН-1 извлекается при рН 3 хлороформом (95,81 %) и смесями хлороформ - бутанол в соотношениях 1:1 (100,74 %) и 9:1 (99,04 %).
3. Предложены оптимальные условия жидкость-жидкостной экстракции КОН-1 из плазмы крови, заключающиеся в предварительном разбавлении биожидкости водой в соотношении 1:1 и двойной экстракции вещества из кислой среды (рН3) смесью хлороформ – бутанол (9:1). Данный способ обеспечивает эффективное извлечение КОН-1 из модельных смесей плазмы крови на уровне 89,00 - 93,05 %.
4. Оптимальным экстрагентом для изолирования КОН-1 из мочи выбран хлороформ, который в условиях модельного эксперимента позволяет извлечь более 97 % вещества.
5. Предложен вариант пробоподготовки плазмы крови на основе твердофазной экстракции на патронах с обращенно-фазным сорбентом Strata C18-E (Phenomenex). Использование на этапе промывки патрона 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты и элюирование аналита подщелоченным метанолом (рН 10) обеспечивает извлечение из модельной смеси 83,22 % аналита.
6. Использование «классических» методов изолирования не обеспечивает эффективного извлечения КОН-1 из модельных смесей, поскольку не учитываются физико-химические свойства вещества. Предложена методика

изолирования КОН-1 из ткани печени, основанная на настаивании биологического объекта с «подщелоченной» водой и дальнейшей экстракции КОН-1 смесью хлороформ – бутанол (9:1) при рН 3. Оптимизация условий позволила увеличить степень извлечения КОН-1 до 50%.

*Результаты проведенных исследований (Глава 4) отражены в публикациях:*

1. Булгакова, Е. А. Экстракция биологически активного соединения КОН-1 из водных растворов / Е. А. Булгакова, Ю. Н. Карпенко, Е. Ю. Тумилович // Материалы 5-ой Междунар. дистанционной науч. конф. «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: междунар. науч. журнал. – 2015. – № 4, 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: материалы Всерос. науч.-метод. конф. с междунар. участием, посвящ. 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: материалы II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию Пермской гос. фарм. акад. (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 / Е. А. Булгакова, Ю. Н. Карпенко, Т. И. Ярыгина // Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление

инновационного развития фармацевтической науки: материалы Всерос. науч.-метод. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию ПГФА. – Пермь, 2016. – № 18. – С. 54 – 57.

6. Разработка методики изолирования биологически активного соединения КОН-1 из внутренних органов / Е. А. Булгакова, Ю. Н. Карпенко, В. В. Бирюкова, И. А. Гребнев // Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием (7 декабря 2017 года). – Пермь, 2017. – № 20. – С. 85 – 88.

## **ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОН-1 В БИЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ВЭЖХ – УФ**

Результаты эксперимента по выбору условий пробоподготовки биологических жидкостей и определения КОН-1 методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием (главы 3-4) легли в основу создания биоаналитических методик для использования при изучении фармакокинетики исследуемого биологически активного соединения.

Как и любые аналитические, биоаналитические методики подлежат валидационной оценке с целью подтверждения их надежности при определении аналитов в различных биологических матрицах. Валидацию разработанных методик проводили с использованием модельных смесей согласно «Руководству по экспертизе лекарственных средств» [45], а также руководств FDA [96] и ЕМА [97]. Были оценены основные валидационные параметры: селективность, линейность, точность и прецизионность.

### **5.1. Валидация методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ - УФ**

#### Описание методики:

В пробирку типа Эппендорф помещают 1 мл мочи, добавляют 50 мкл кислоты хлористоводородной разведенной 8,3% и проводят двукратную экстракцию в течение 1 мин двумя порциями хлороформа по 0,5 мл. Далее центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин, отделяют органический слой и испаряют его в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл метанола, фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм и исследуют методом ВЭЖХ.

#### Условия хроматографического анализа:

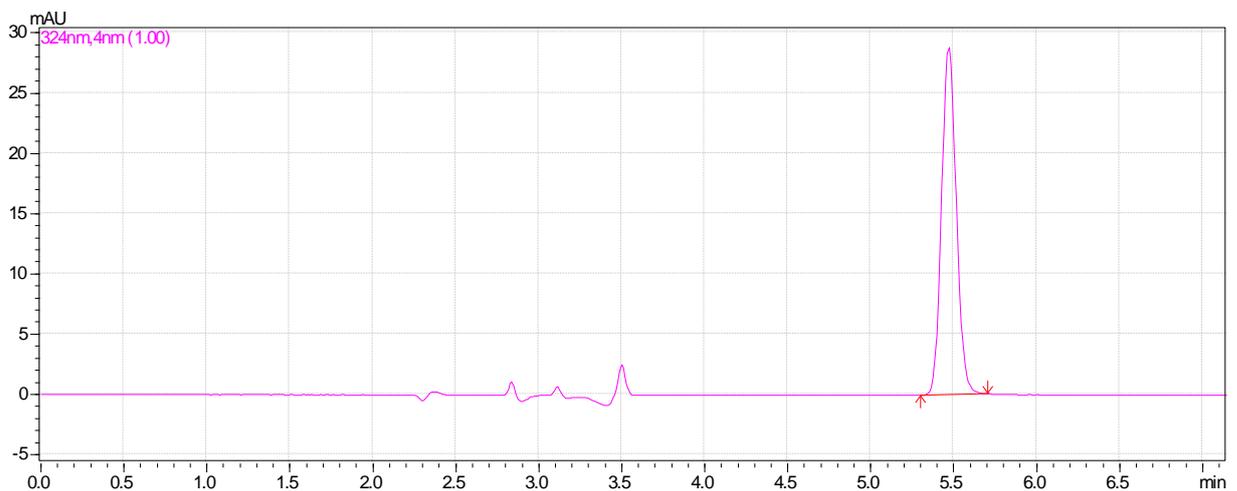
- хроматографическая колонка – «Luna 3uC18(2) 100A» (Phenomenex) (250 × 4,6 мм);

- подвижная фаза – ацетонитрил : фосфатный буфер (pH 7) 25:75;
- режим элюирования – изократический;
- скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- температура термостата колонки – 40 ° C;
- длина волны детектирования – 324 нм;
- объем вводимой пробы – 10 мкл.

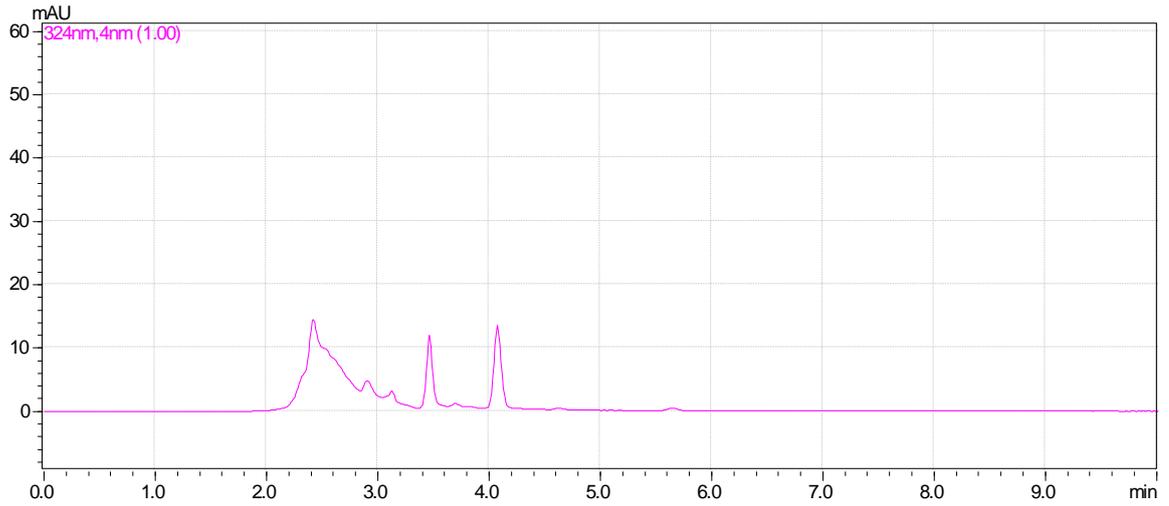
Расчет концентрации КОН-1 в извлечениях из мочи проводят по методу внешнего стандарта.

**Селективность** разработанных условий была оценена путем сравнения хроматограмм стандартного раствора КОН-1 (20 мкг/мл), экстрактов из «холостых» образцов мочи лабораторных животных (крысы) и модельных смесей мочи с содержанием аналита 0,6 мкг/мл (уровень ПКО) и 20 мкг/мл. Примеры хроматограмм приведены на рисунках 5.1.1 – 5.1.4.

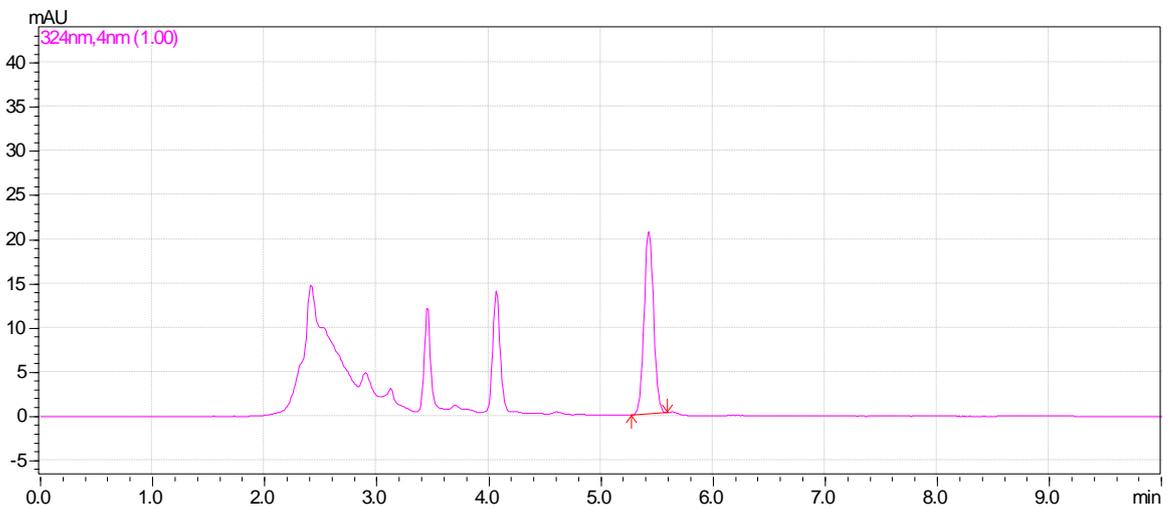
Анализ хроматограмм «холостых» образцов показал отсутствие мешающих пиков со временами удерживания, близкими к времени удерживания КОН-1, что свидетельствует о специфичности предлагаемых условий.



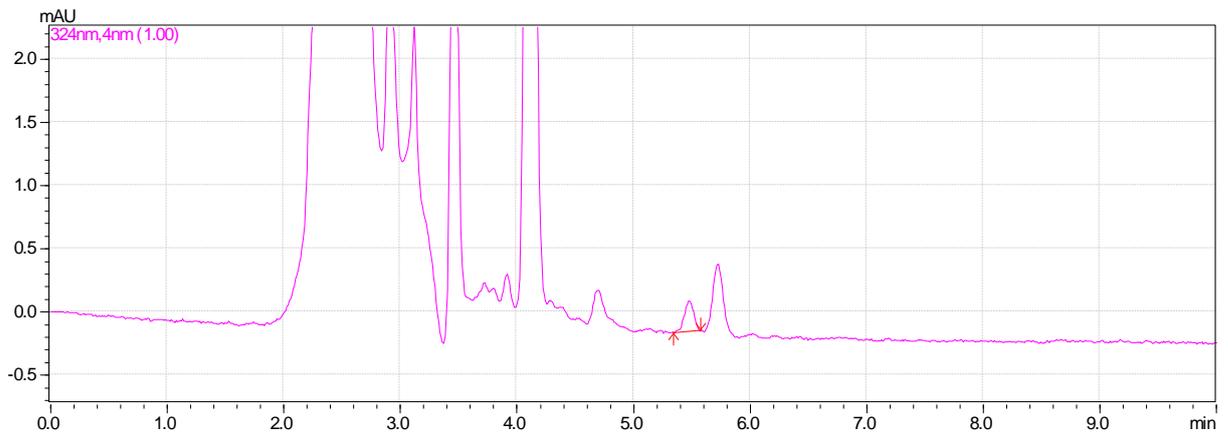
**Рисунок 5.1.1 – Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (10 мкг/мл)**



**Рисунок 5.1.2 – Хроматограмма извлечения из «холостой» пробы мочи**

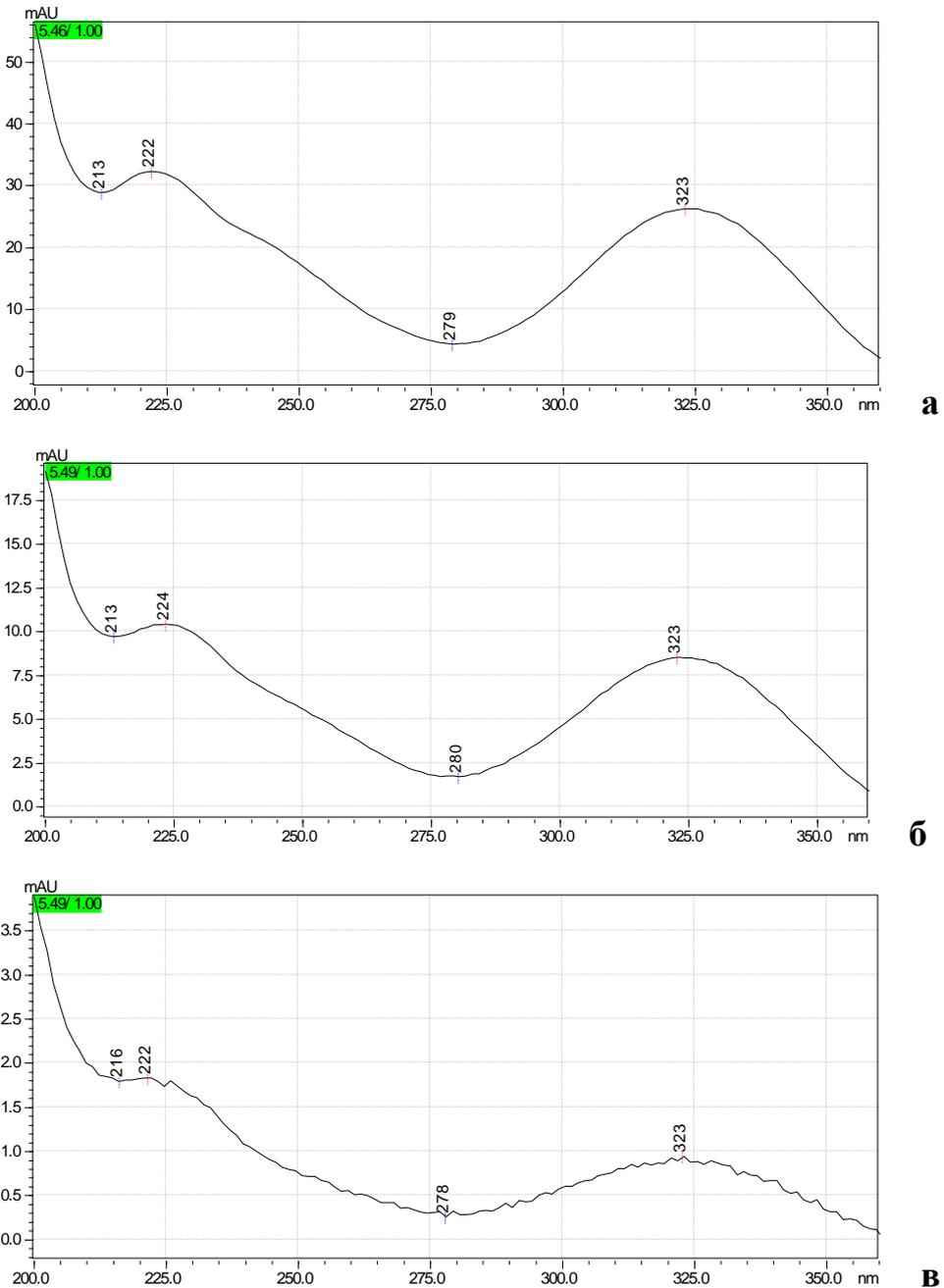


**Рисунок 5.1.3 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси мочи  
(концентрация КОН-1 20 мкг/мл)**



**Рисунок 5.1.4 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси мочи  
(концентрация КОН-1 0,6 мкг/мл (ПКО))**

Времена удерживания, а также спектры поглощения КОН-1 в экстрактах из мочи соответствуют обозначенным параметрам в стандартном растворе вещества (рис. 5.1.5).



**Рисунок 5.1.5 – Спектры поглощения КОН-1**

**а – в стандартном растворе (концентрация КОН-1 10 мкг/мл)**

**б – в экстракте из модельной смеси мочи (концентрация КОН-1 20 мкг/мл)**

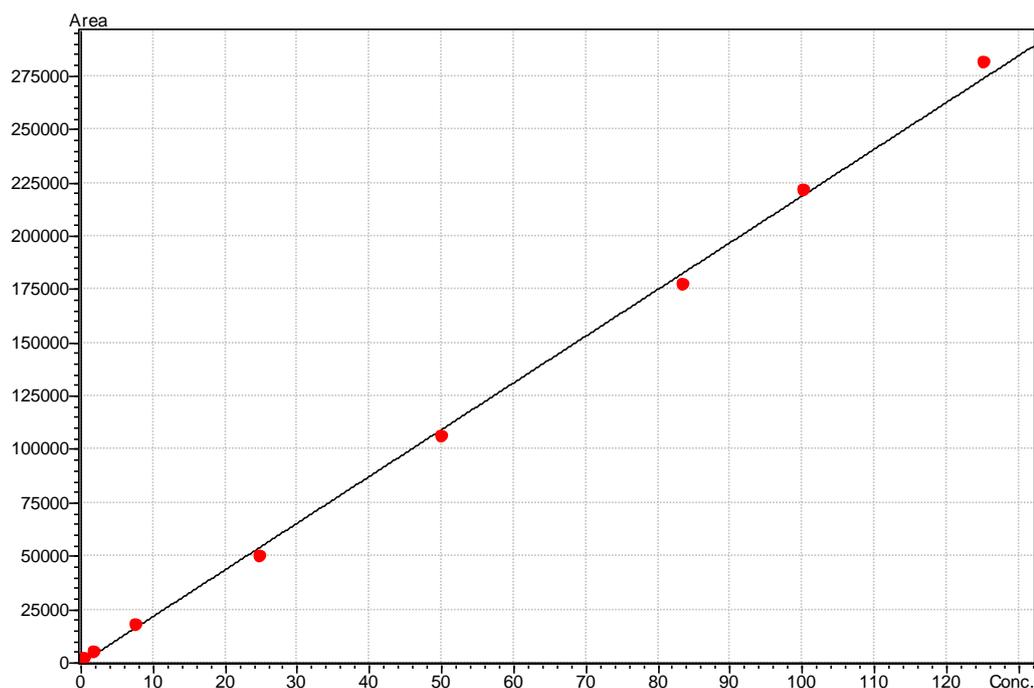
**в – в экстракте из модельной смеси мочи (концентрация КОН-1 0,6 мкг/мл (ПКО))**

**Линейность методики.** Для построения калибровочного графика были проанализированы 8 образцов модельных смесей мочи с содержанием КОН-1 в диапазоне от 0,6 до 125 мкг/мл. Каждый образец готовился к анализу в соответствии с методикой пробоподготовки и хроматографировался 3 раза. Для построения градуировочной зависимости рассчитывали среднее значение площадей пиков (таблица 5.1.1) от концентрации вещества в растворе. Градуировочный график представлен на рисунке 5.1.6.

**Таблица 5.1.1 – Данные для построения калибровочного графика количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ**

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Площадь хроматографического пика (среднее значение 3 определений)
0,69	1368
2,09	4690
7,79	17128
25,10	49324
50,20	105432
83,30	178360
100,40	220802
125,50	281043

Уравнение калибровочного графика имеет вид  $S = 2189 \times C$  ( $S$  – площадь пика,  $C$  – концентрация, мкг/мл). Коэффициент корреляции  $R^2$  составил 0,99865, что подтверждает линейность методики в указанном диапазоне. Предел обнаружения КОН-1 при использовании разработанной методики составил 0,2 мкг/мл, предел количественного определения (ПКО) – 0,6 мкг/мл.



**Рисунок 5.1.6 – Калибровочный график количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ**

Для оценки приемлемости линейности рассчитывали отклонения полученных по калибровочному графику значений концентраций КОН-1 от фактических. Полученные результаты отражены в таблице 5.1.2.

**Таблица 5.1.2 - 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%						

Относительная погрешность рассчитанной концентрации от фактической для точки, соответствующей пределу количественного определения (ПКО), не превышает 20%, для остальных точек – 15%, что соответствует требованиям [45, 96, 97].

**Точность (правильность) и прецизионность.** Для оценки данных параметров готовили по 6 модельных биообразцов на 5 уровнях концентраций КОН-1: 0,56; 3,36; 16,80; 62,75 и 111,56 мкг/мл, охватывающих аналитический диапазон методики. Подготовку образцов для анализа осуществляли в соответствии с разработанной методикой пробоподготовки. Каждое извлечение хроматографировали не менее 2 раз. Прецизионность и правильность методики оценивались по величинам относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной величины погрешности ( $\delta$ ,%), соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 5.1.3.

**Таблица 5.1.3 - Метрологические характеристики методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ**

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Найденная концентрация, мкг/мл	$\bar{x}$ (n = 6)	SD	RSD, %	$\delta$ , %
1	2	3	4	5	6
0,56	0,64	0,60	0,05	8,10	7,14
	0,58				
	0,66				
	0,53				
	0,62				
	0,57				
3,36	3,12	3,57	0,37	10,26	6,25
	3,41				
	3,90				
	3,75				
	4,01				
	3,24				
16,80	16,87	17,31	0,50	2,90	3,04
	16,95				
	17,42				
	16,84				
	17,69				
	18,06				

1	2	3	4	5	6
62,75	55,51	57,76	1,51	2,61	-7,95
	57,65				
	58,47				
	56,54				
	59,57				
	58,79				
111,56	98,57	102,76	3,76	3,65	-7,89
	101,98				
	102,53				
	109,33				
	100,05				
	104,10				

Значения относительного стандартного отклонения и относительной величины погрешности не превышают 20% для образца с концентрацией, соответствующей ПКО и 15% для остальных образцов, что удовлетворяет критериям приемлемости [45, 96, 97].

## **5.2. Разработка и валидация методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ**

Ранее проведенный эксперимент показал, что метод прямого осаждения белков обеспечивает высокий выход КОН-1 при изолировании его из плазмы крови (более 90%), отличается простотой пробоподготовки и экспрессностью, что является важным при анализе большого количества образцов при проведении фармакокинетических исследований. Поэтому была оценена возможность использования данного варианта подготовки плазмы крови к хроматографическому исследованию методом ВЭЖХ-УФ.

### **5.2.1. Обоснование выбора внутреннего стандарта**

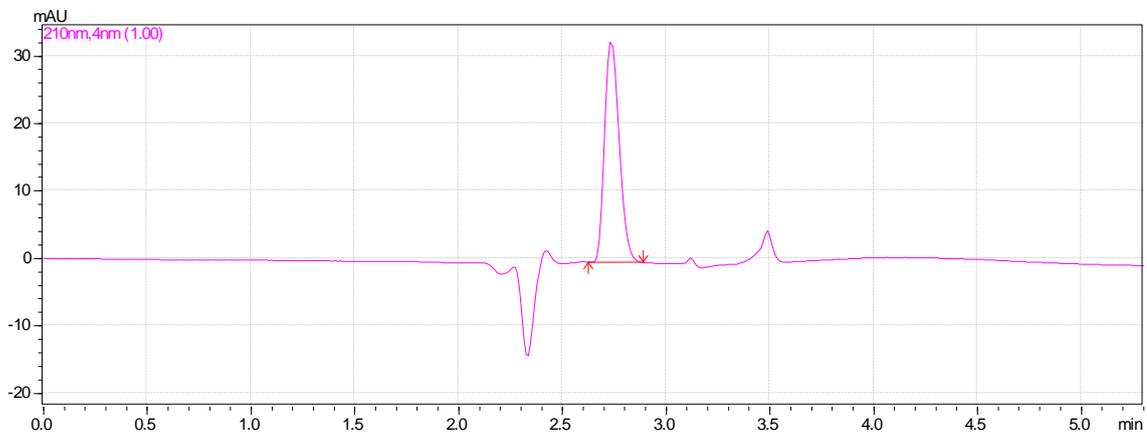
В основу количественного определения КОН-1 в плазме крови был положен метод внутреннего стандарта. Необходимость применения внутреннего стандарта

обусловлена тем, что при изолировании аналитов из плазмы крови происходят большие потери, нежели из мочи. Использование внутреннего стандарта позволяет учитывать потери исследуемых веществ в процессе подготовки пробы.

На этапе выбора внутреннего стандарта нами были апробированы соединения, которые имеют близкую с КОН-1 химическую структуру – пирацетам и фенотропил (4 –фенилпирацетам).

Предварительно была оценена пригодность разработанных хроматографических условий определения КОН-1 в плазме для анализа пирацетама и фенотропила. Эксперимент проводили на водных растворах пирацетама и фенотропила с концентрацией 20 мкг/мл. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм.

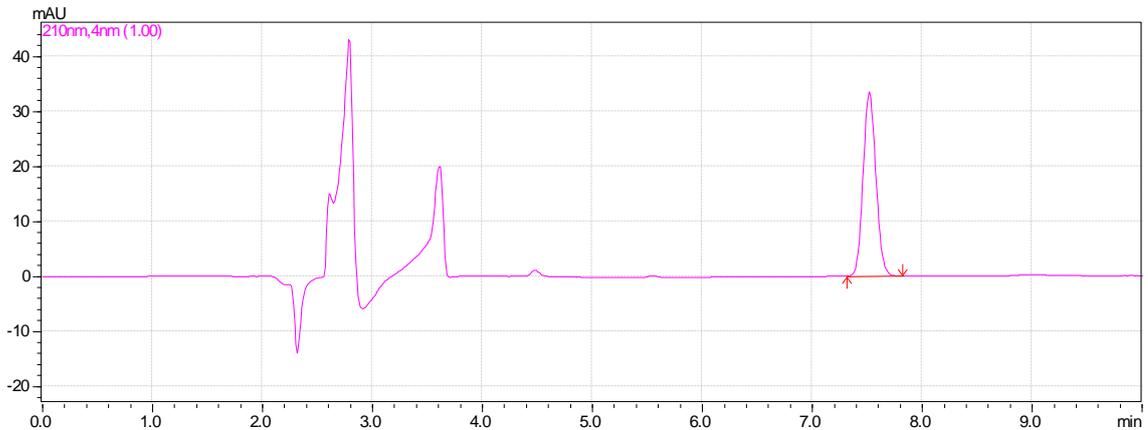
Анализ показал, что пирацетам в данных условиях имеет время удерживания 2,7 мин, что говорит о низкой способности данного соединения удерживаться обращенно-фазным сорбентом за счет высокой гидрофильности и, следовательно, непригодности его как внутреннего стандарта (рис.5.2.1.1).



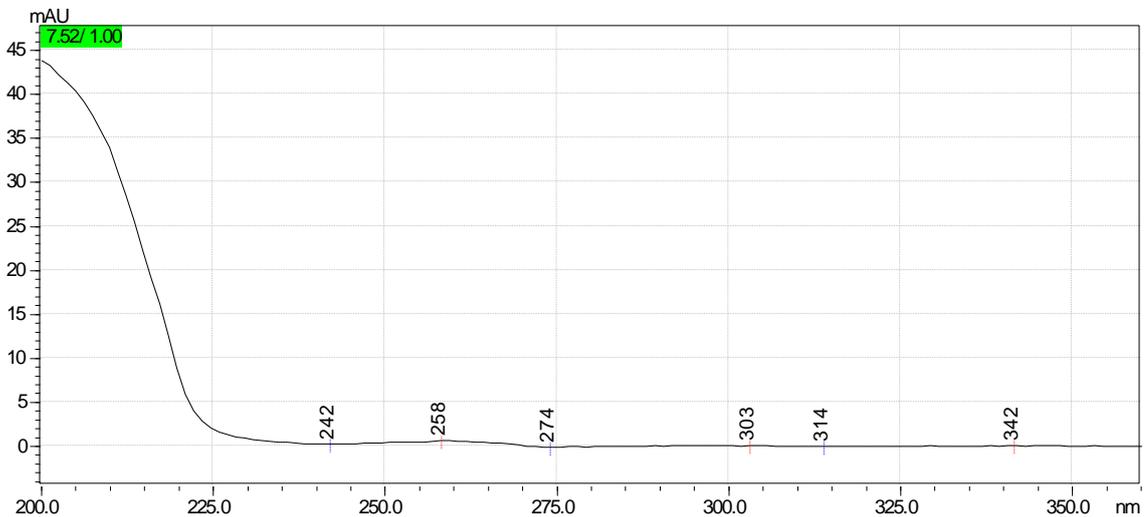
**Рисунок 5.2.1.1 - Хроматограмма стандартного водного раствора пирацетама с концентрацией 20 мкг/мл**

Анализ стандартного раствора фенотропила в разработанных хроматографических условиях показал, что соединение элюируется в виде симметричного пика со временем удерживания 7,5 мин, что оптимально для анализа КОН-1. Максимальное поглощение фенотропила в подвижной фазе

ацетонитрил - фосфатный буфер с рН 7 (25:75) наблюдается при длине волны 210 нм (рис. 5.2.1.2 – 5.2.1.3).



**Рисунок 5.2.1.2 – Хроматограмма стандартного водного раствора фенотропила (20 мкг/мл)**



**Рисунок 5.2.1.3 – УФ-спектр фенотропила в подвижной фазе**

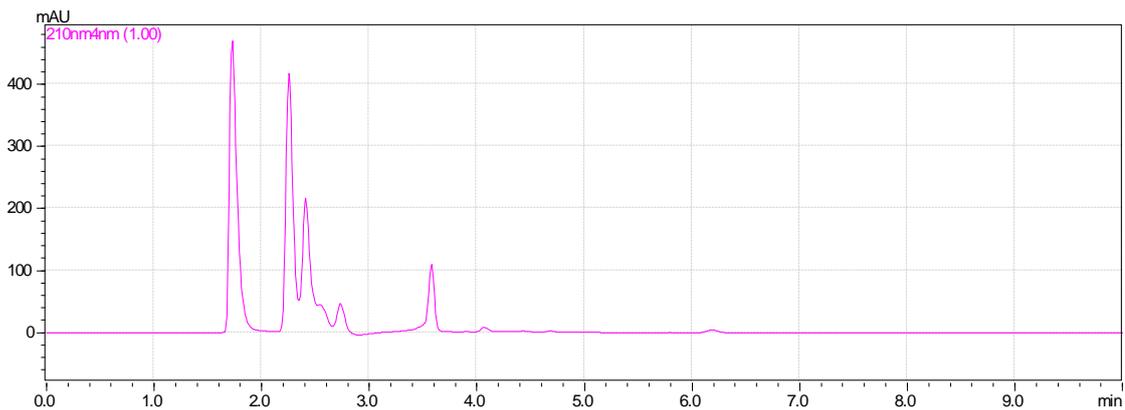
Поскольку биоаналитическая методика включает не только этап хроматографического исследования, но и этап пробоподготовки биологического объекта, нами была оценена пригодность прямого осаждения белков плазмы крови метанолом для извлечения потенциального внутреннего стандарта фенотропила. Анализ проводили на модельных смесях плазмы крови с концентрацией фенотропила 20 мкг/мл.

Установлено, что фенотропил достаточно эффективно (более 65%) и воспроизводимо ( $RSD < 2$ ) извлекается методом прямого осаждения (таб. 5.2.1.1).

**Таблица 5.2.1.1 – Результаты изолирования фенотропила из плазмы крови методом прямого осаждения белков метанолом**

Концентрация фенотропила в модельной смеси, мкг/мл	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
20	67,04	$X_{cp.} = 65,72$ $SD = 1,16$ $RSD (\%) = 1,76$
	64,21	
	66,83	
	65,72	
	65,96	
	64,55	

Кроме того, на хроматограмме супернатанта из холостой плазмы крови отсутствуют пики мешающих веществ со временем удерживания, соответствующим фенотропилу (рис. 5.2.1.4).



**Рисунок 5.2.1.4 - Хроматограмма экстракта из «холостой» плазмы крови**

Поскольку условия, предложенные для определения КОН-1 в плазме крови, являются пригодными для фенотропила, данное вещество может выступать в качестве внутреннего стандарта.

## 5.2.2. Валидация методики

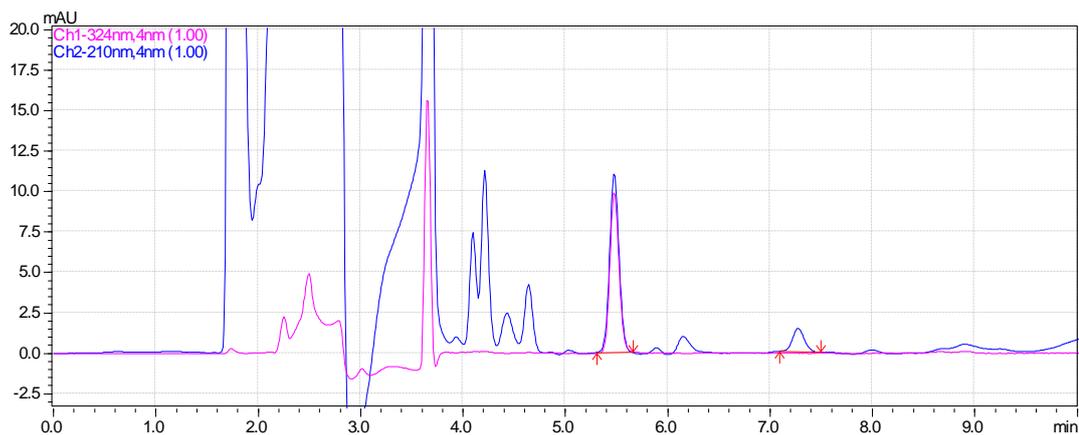
По результатам проведенных исследований нами предложена следующая методика количественного определения КОН-1 в плазме крови с использованием внутреннего стандарта фенотропила:

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 мин при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы с размером пор 0,45 мкм и исследуют методом ВЭЖХ.

*Условия хроматографического анализа:*

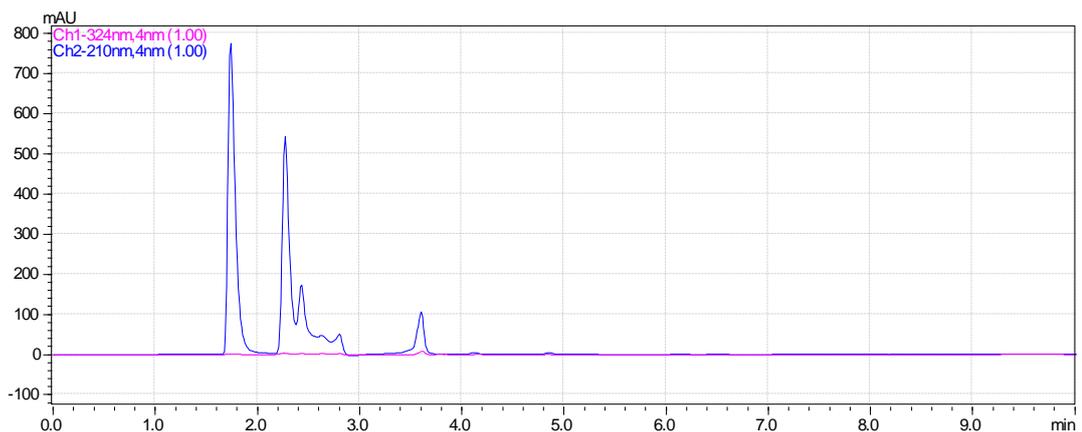
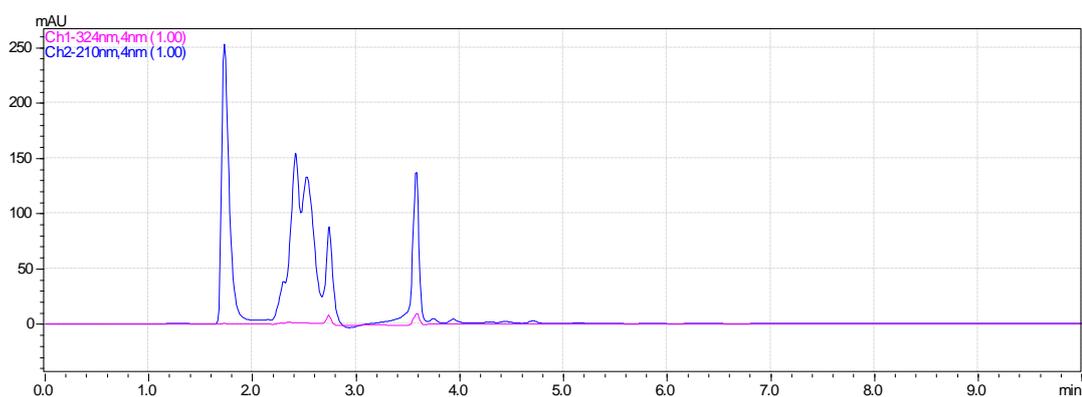
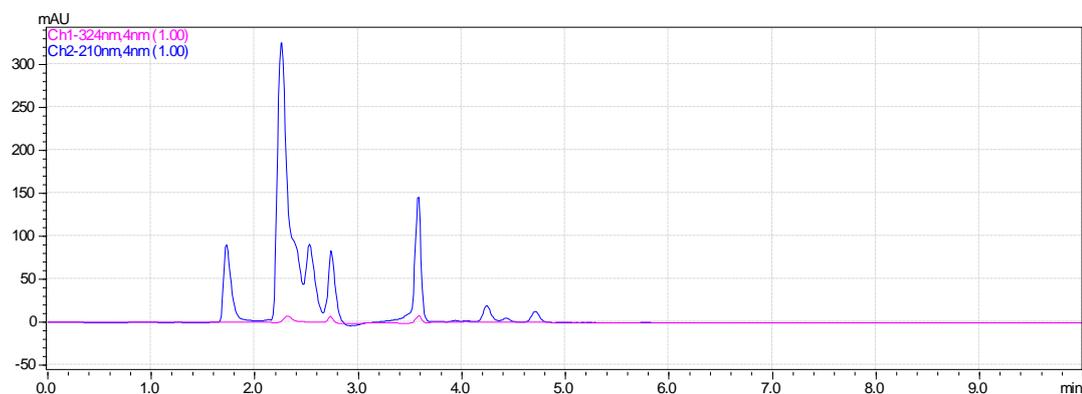
- хроматографическая колонка – «Luna 3uC18(2) 100A» (Phenomenex) (250 × 4,6 мм);
- подвижная фаза – ацетонитрил: фосфатный буфер (pH 7) 25:75;
- режим элюирования – изократический;
- скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- температура термостата колонки – 40°C;
- длина волны детектирования – 324 нм (КОН-1), 210 нм (фенотропил);
- объем вводимой пробы – 10 мкл.

**Селективность** разработанных условий была оценена путем сравнения хроматограмм стандартных растворов КОН-1 (1 мкг/мл) и фенотропила (20 мкг/мл), холостых образцов плазмы крови человека и лабораторных животных (крыс, кроликов), модельных смесей плазмы с известным содержанием аналита. Идентификацию пиков КОН-1 и фенотропила на хроматограммах извлечений проводили по времени удерживания и УФ – спектрам, сравнивая с аналогичными параметрами на хроматограмме стандартного раствора вещества. Пример хроматограммы экстракта из модельной смеси приведен на рис. 5.2.2.1.



**Рисунок 5.2.2.1 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы крови (концентрация КОН-1 5 мкг/мл)**

Анализ «холостых» хроматограмм извлечений, полученных из различных источников плазмы (человека, крысы, кролика), показал отсутствие мешающих пиков на месте выхода КОН-1 и внутреннего стандарта (рис. 5.2.2.2), что свидетельствует о специфичности методики.

**а****б****в**

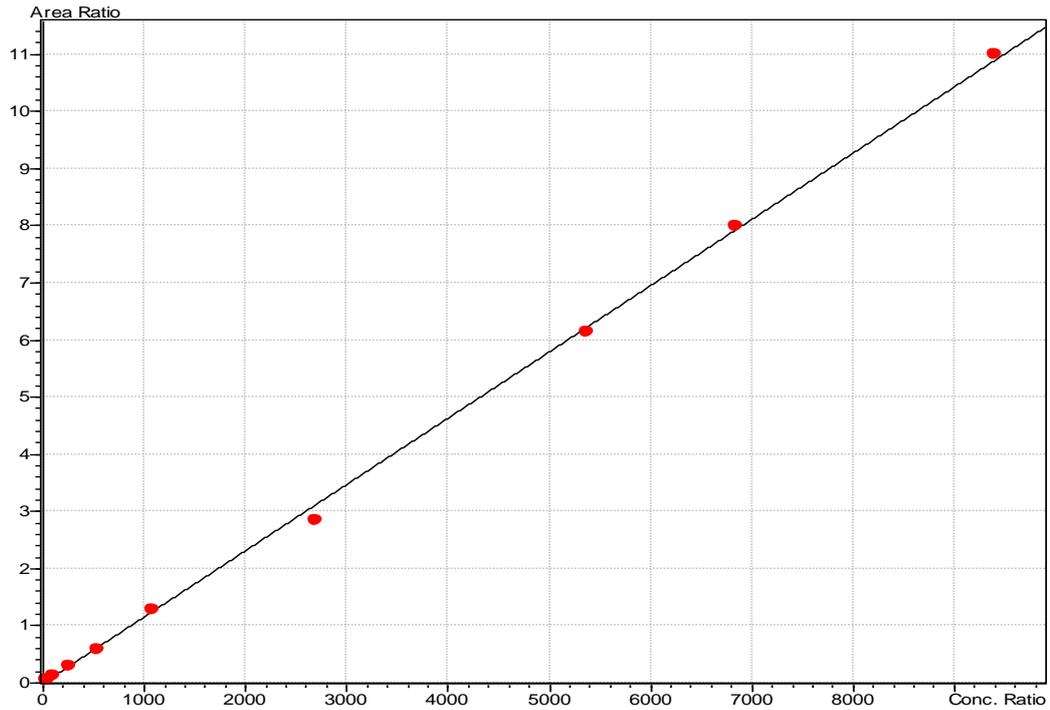
**Рисунок 5.2.2.2 – Хроматограмма супернатанта из холостой пробы плазмы крови человека (а), кролика (б), крысы (в)**

**Линейность методики.** Для построения калибровочного графика были проанализированы 10 образцов модельных смесей плазмы с содержанием КОН-1 в диапазоне от 36 до 9400 нг/мл. Каждый образец готовился к анализу в соответствии с методикой пробоподготовки и хроматографировался 3 раза. Результаты определения линейности приведены в таблице 5.2.2.1 и на рисунке 5.2.2.3. Градуировочная зависимость описывается уравнением  $Y = 0,00115952 \times C$  ( $Y$  – отношение площадей пиков КОН-1 и внутреннего стандарта,  $C$  –

концентрация КОН-1, нг/мл). Коэффициент корреляции  $R^2$  составил 0,9993658, что свидетельствует о линейности методики в указанном диапазоне концентраций.

**Таблица 5.2.2.1 - Данные для построения калибровочного графика количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ**

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, нг/мл	Соотношение площадей пиков КОН-1 и внутреннего стандарта (среднее значение 3 определений)
36	0,0395890
54	0,0585338
108	0,1191914
270	0,2865046
540	0,5671227
1080	1,287002
2690	2,842784
5380	6,142415
6840	7,986911
9400	10,99304



**Рисунок 5.2.2.3 – Калибровочный график количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ**

Был произведен обратный перерасчет концентраций калибровочных модельных смесей по калибровочному графику (таб. 5.2.2.2). Отклонения полученных значений концентраций КОН-1 от фактических значений не превышает 15%, что соответствует нормам действующих руководств [45, 96, 97].

**Таблица 5.2.2.2 – Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений**

$C_{\text{факт.}, \text{нг}}$	36	54	108	270	540	1080	2690	5380	6840	9400
$C_{\text{рассчит.}, \text{нг}}$	33	49	99	238	473	1070	2375	5125	6658	9163
$\varepsilon, \%$	-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%								

Предел обнаружения КОН-1 при использовании разработанной методики составил 20 нг/мл, предел количественного определения – 30 нг/мл.

**Прецизионность и правильность.** Для оценки данных параметров готовили по 6 модельных биообразцов на 6 уровнях концентраций КОН-1: 39, 120, 784, 1176, 4706, 7530 нг/мл. Подготовку образцов для анализа осуществляли в соответствии с разработанной методикой пробоподготовки. Каждое извлечение хроматографировали не менее 2 раз. Прецизионность и правильность методики оценивались по величинам относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной величины погрешности ( $\delta$ ,%), соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 5.2.2.4.

**Таблица 5.2.2.4 - 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	$\bar{x}$ (n = 6)	SD	RSD, %	$\delta$ , %
1	2	3	4	5	6
39	38,72	39,61	2,94	7,41	1,6
	36,16				
	41,74				
	43,44				
	41,04				
	36,58				
120	133,75	135,36	11,24	8,31	12,8
	122,23				
	133,12				
	130,19				
	136,96				
	155,92				
784	766,51	798,24	70,20	8,80	1,8
	888,90				
	756,97				
	846,08				
	697,38				
	833,62				
1176	1234,54	1146,76	91,52	7,98	-2,5
	1112,13				
	1070,64				
	1028,86				
	1176,22				
	1258,16				

1	2	3	4	5	6
4706	4566,76	4399,71	162,14	3,69	-6,5
	4157,21				
	4254,00				
	4482,51				
	4409,41				
	4528,38				
7530	8003,44	7786,57	118,35	1,52	3,4
	7800,08				
	7713,15				
	7754,97				
	7789,34				
	7658,42				

Полученные результаты контроля не превышают 15%, допускаемых для биоаналитических методик, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических ошибок в результатах анализа.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Разработана методика определения КОН-1 в моче, включающая пробоподготовку путем жидкость-жидкостной экстракции из «кислой» среды и анализ полученного извлечения методом ВЭЖХ-УФ. Валидационная оценка методики показала ее селективность, линейность в диапазоне от 0,69 до 125,5 мкг/мл (коэффициент корреляции более 0,99), прецизионность и правильность (коэффициент вариации и относительная погрешность определения не превышают 10% на всех исследованных уровнях концентраций КОН-1).
2. Предложена методика количественного определения КОН-1 в плазме крови, основанная на простом, эффективном и экспрессном извлечении вещества из биообъекта путем прямого осаждения белков плазмы метанолом, с последующим хроматографическим анализом.
3. Селективность условий разработанной методики определения КОН-1 в плазме крови доказана путем анализа «холостых» проб плазмы, полученных от разных источников (человека, крыс и кроликов). Установлено, что на «холостых» хроматограммах отсутствуют посторонние пики, по времени удерживания совпадающие с пиками КОН-1 и внутреннего стандарта фенотропила.
4. Линейность методики соблюдалась в широком диапазоне концентраций КОН-1 в плазме крови (36 – 9400 нг/мл). Коэффициент корреляции составил более 0,999.
5. Прецизионность и правильность разработанной методики, оцененная на 6 уровнях концентраций КОН-1 в модельных смесях, показала ее соответствие требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Коэффициент вариации и относительная погрешность определений не превышают 15%.

*Результаты проведенных исследований (Глава 5) отражены в публикациях:*

1. 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.

2. 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.

## ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОИ-1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ВЭЖХ – МС/МС)

### 6.1. Изучение условий хроматографического разделения КОИ-1 на стандартных растворах

Разработка методики проводилась на жидкостном хроматографе «LCMS - 8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении). Разделение осуществляли на хроматографической колонке из нержавеющей стали (150\*3,0 мм, Luna 3uC18(2) 100A) с обращенно-фазным сорбентом.

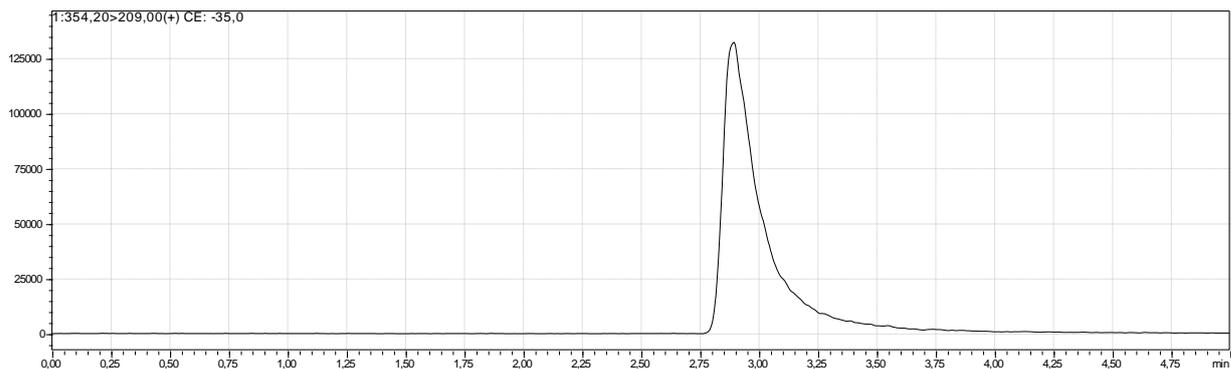
В качестве объекта исследования был использован стандартный раствор КОИ-1 в метаноле с концентрацией 5 мкг/мл.

Проведенные исследования по выбору условий анализа КОИ-1 методом ВЭЖХ с УФ-детектированием (Глава 3) показали, что оптимальной подвижной фазой с точки зрения приемлемости хроматографических параметров (коэффициента емкости, селективности и эффективности разделения, симметрии пиков), а также максимального отклика детектора наблюдается при использовании элюентов на основе ацетонитрила и фосфатного буфера с рН 7. Однако, выбор элюентов для ВЭЖХ-МС имеет свои ограничения, связанные с детектированием. Традиционные для ВЭЖХ подвижные фазы на основе неорганических буферов категорически запрещены в связи со способностью их компонентов накапливаться в источнике ионизации и препятствовать ионизации исследуемых веществ.

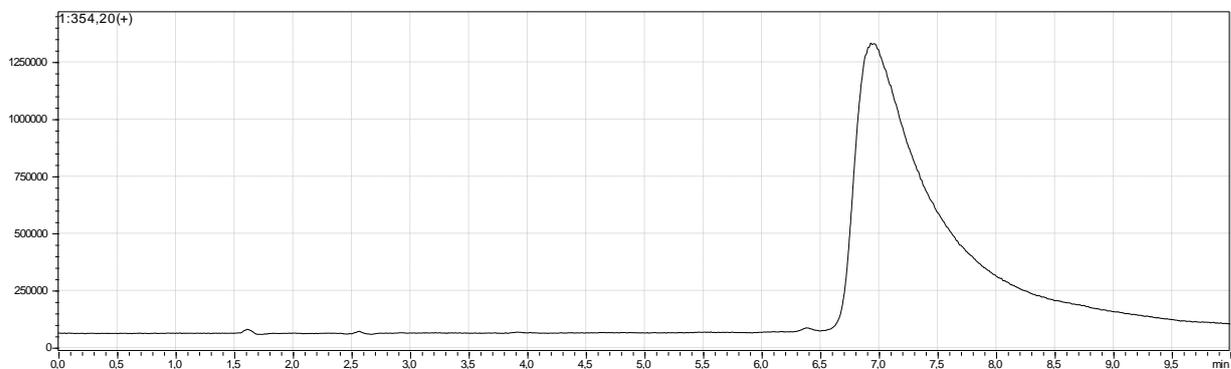
Поэтому на этапе выбора оптимального состава подвижной фазы нами были апробированы стандартные для ВЭЖХ-МС водно-ацетонитрильные и водно-метанольные смеси с добавлением муравьиной кислоты или ацетатного буферного раствора.

При применении кислых элюентов в различных соотношениях форма хроматографического пика КОН-1 была неудовлетворительной и характеризовалась сильно затянутым задним фронтом (рисунки 6.1.1 – 6.1.2).

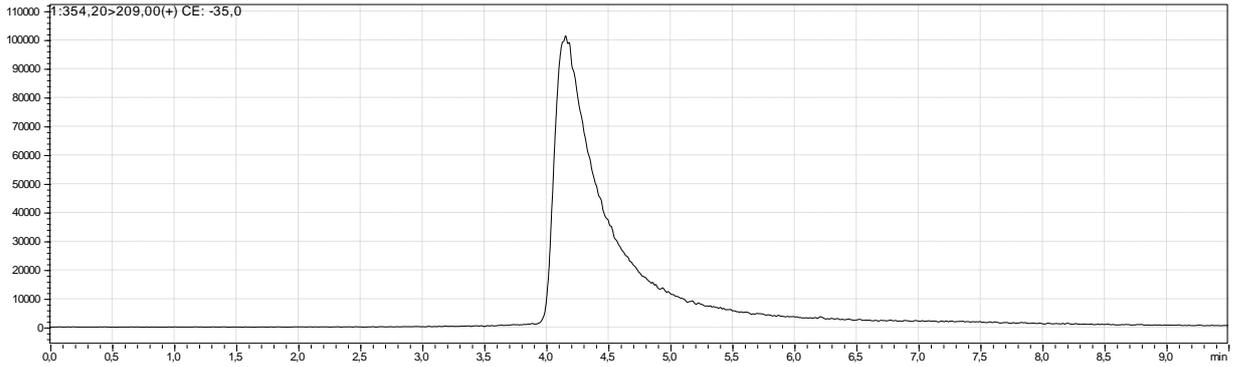
Прием градиентного элюирования, а также использование в составе элюента 0,05 М ацетатного буфера принципиально не улучшило ситуацию (рисунки 6.1.3 – 6.1.4).



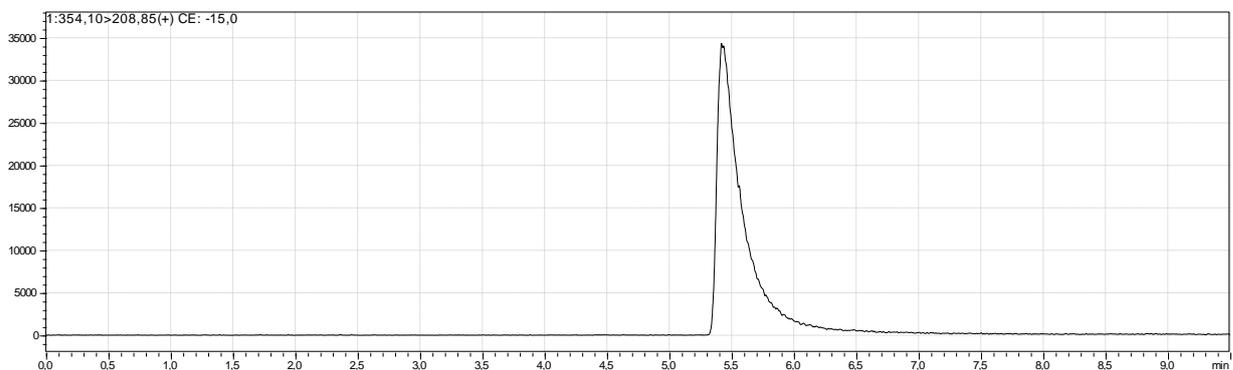
**Рисунок 6.1.1 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) с использованием подвижной фазы 0,1% раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил 50:50**



**Рисунок 6.1.2 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) с использованием подвижной фазы 0,1% раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил 40:60**



**Рисунок 6.1.3 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) с использованием подвижной фазы 0,1% раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил; градиентное элюирование с 40 до 80 % ацетонитрила**

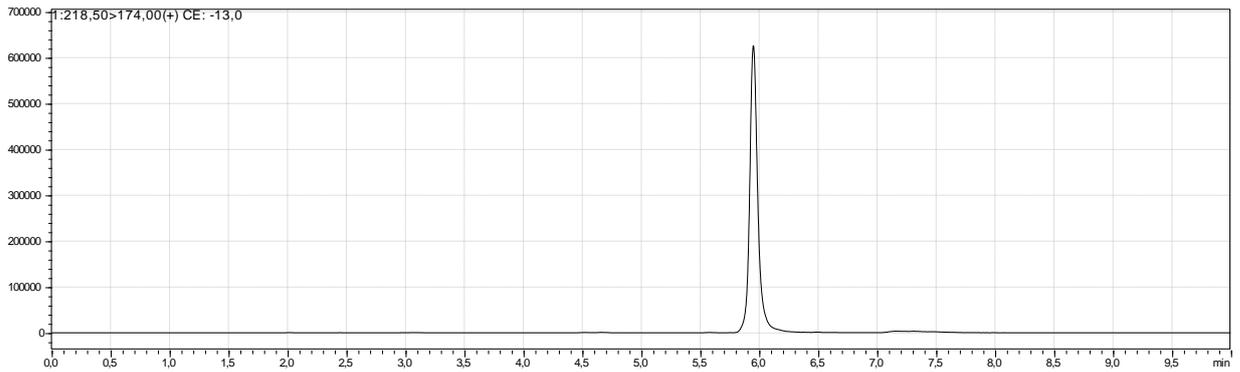


**Рисунок 6.1.4 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) с использованием подвижной фазы ацетатный буфер 0,05 М – ацетонитрил; градиентное элюирование с 20 до 50 % ацетонитрила**

Элюенты на основе метанола плохо элюировали аналит из хроматографической колонки. Время удерживания КОН-1 при использовании подвижной фазы состава 0,1% раствор муравьиной кислоты – метанол (50:50) составило более 20 минут.

Далее нами были апробированы элюенты на основе воды и ацетонитрила, применялись варианты изократического и градиентного элюирования.

Оптимальной формы пика исследуемого соединения удалось достигнуть, используя градиентное элюирование, при линейном возрастании доли ацетонитрила в ПФ от 20% до 50% за 7 минут. Время удерживания КОН-1 в данных условиях составило 5,7 мин. Хроматограмма представлена на рисунке 6.1.5.



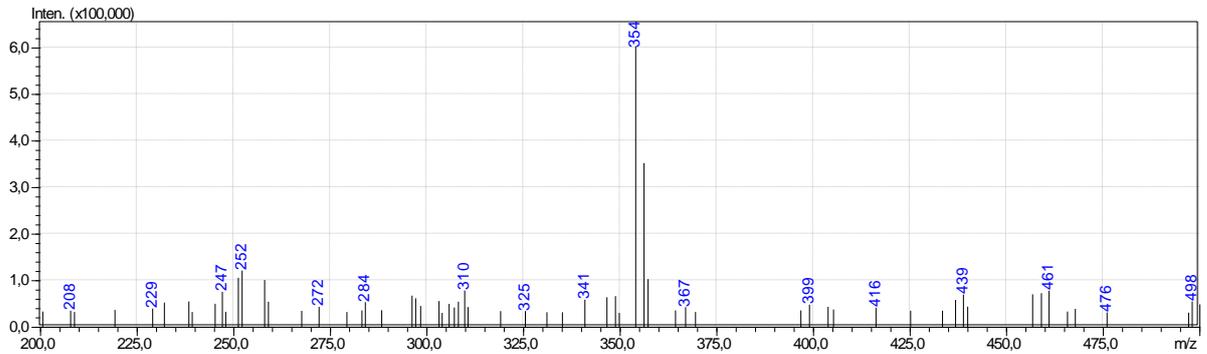
**Рисунок 6.1.5 - Хроматограмма стандартного раствора КОН-1 (5 мкг/мл) с использованием подвижной фазы вода – ацетонитрил; (градиентное элюирование с 20 до 50 % ацетонитрила за 7 минут)**

Таким образом, нами были предложены следующие условия хроматографического определения КОН-1 методом ВЭЖХ-МС, которые легли в основу разработки методики количественного определения вещества в плазме крови:

Оборудование	высокоэффективный жидкостный хроматомасс-спектрометр «LCMS-8050» (Shimadzu);
Детектор	тройной квадруполь «LCMS-8050» с источником двойной ионизации DUIS-8050 SetIVD (для ESI и химической ионизации при атмосферном давлении APCI);
Хроматографическая колонка	150*3,0 мм, Luna 3uC18(2) 100A;
Элюент	ацетонитрил – вода;
Режим элюирования	градиентный, с увеличением концентрации ацетонитрила с 20% до 50% за 7 мин.;
Скорость подачи элюента	300 мкл/мин;
Температура колонки	40 °С;
Объем вводимой пробы	1 мкл.

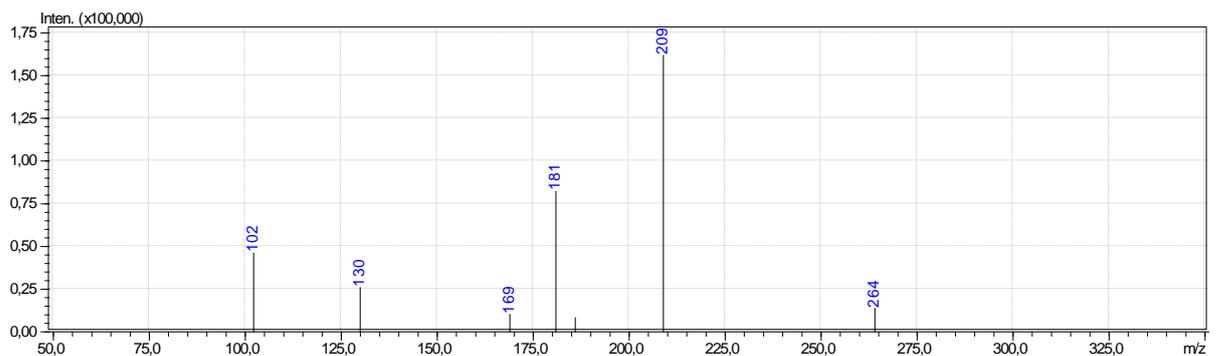
## 6.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования КОН-1

При разработке условий детектирования нами был сняты масс-спектры стандартного раствора КОН-1 в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Установлено, что масс-спектр первого порядка КОН-1 содержит интенсивный ион протонированной молекулы с  $m/z$  354 (рисунок 6.2.1).



**Рисунок 6.2.1 - Масс-спектр КОН-1 первого порядка, снятый в режиме положительной ионизации**

Следующим этапом разработки масс-спектрометрического детектирования стал выбор подходящих ионных переходов (режим МРМ). На рисунке 6.2.2 представлен масс-спектр фрагментных ионов КОН-1, полученных при сканировании на третьем квадруполе масс-анализатора.



**Рисунок 6.2.2 – Масс-спектр фрагментных ионов КОН-1**

Наиболее интенсивными ионами, полученными при фрагментации материнского иона ( $m/z$  354) оказались ионы с массовыми числами 209 и 181. С помощью опции автоматической оптимизации прибора были оптимизированы энергии соударений (collision energy) для ионных переходов  $354 \rightarrow 209$  и  $354 \rightarrow$

181. Энергия соударений (СЕ) для данных переходов составила –28 эВ и –39 эВ соответственно. Поскольку наибольшую чувствительность показал переход 354 → 209, этот канал в дальнейшем использовался для количественного определения КОН-1 (таб. 6.2.1).

**Таблица 6.2.1 – Результаты автоматической оптимизации прибора по выбору оптимального значения СЕ (энергии соударений)**

Переход 354 → 209		Переход 354 → 181	
Значение СЕ	Интенсивность пика	Значение СЕ	Интенсивность пика
-10	61 079	-10	1 688
-12	101 962	-12	2 414
-15	1 296 032	-15	4 735
-20	626 906	-20	14 801
-25	1 116 634	-25	43 413
<b>-28</b>	<b>1 991 862</b>	-30	103 621
-30	1 131 275	-35	175 634
-35	770962	<b>-39</b>	<b>311 469</b>

По результатам автоматической оптимизации были также установлены основные температурные параметры детектора и скорости потока газа-распылителя, нагревающего и осушающего газов. Получены следующие результаты:

Интерфейс	DUIS (электроспрей + химическая ионизация)
Поток газа-распылителя	3 L/min
Поток нагревающего газа	10 L/min
Поток осушающего газа	10 L/min
Температура интерфейса	200 °С
Температура DL	300 °С
Температура Heat Block	400 °С

### **6.3. Разработка методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС**

При выборе оптимального способа пробоподготовки для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС были проанализированы извлечения КОН-1 из плазмы крови, полученные путем прямого осаждения белков плазмы и жидкость-жидкостной экстракции.

Пробоподготовку модельных смесей плазмы к анализу осуществляли по предложенным ранее методикам (глава 4).

Извлечения, полученные прямым осаждением белков плазмы крови, оказались наименее пригодными из-за высокого влияния «матричного» эффекта, обусловленного влиянием эндогенных компонентов биологической матрицы (липиды, фосфолипиды, жирные кислоты и др.) 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 КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

Количественное определение аналитов методом ВЭЖХ-МС/МС предполагает использование внутреннего стандарта, обусловленное как возможными потерями вещества на этапе пробоподготовки, так и спецификой работы масс-спектрометрического детектора.

Нами была оценена возможность использования фенотропила в качестве внутреннего стандарта с точки зрения пригодности предлагаемых условий пробоподготовки биологического образца и хроматомасс-спектрометрического анализа.

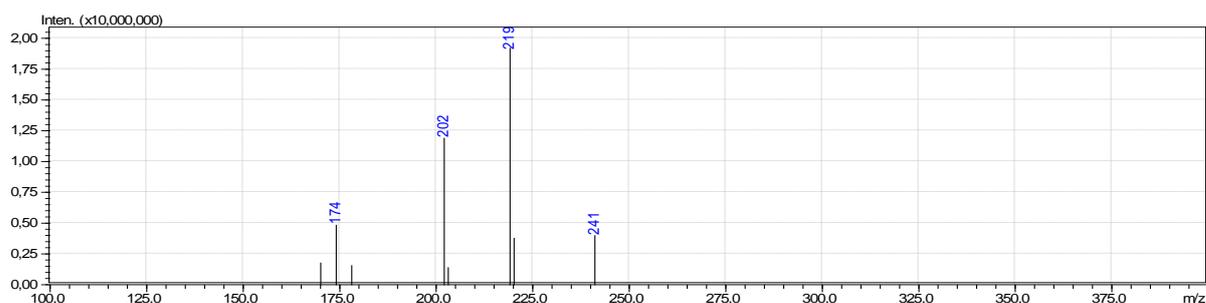
Для этого были приготовлены модельные смеси плазмы крови с концентрацией фенотропила 5 мкг/мл. Жидкость – жидкостную экстракцию фенотропила осуществляли согласно методике, описанной в п. 4.2.2. диссертации.

Установлено, что фенотропил эффективно извлекается из «кислой» среды смесью хлороформ-бутанол (9:1). Степень экстракции в среднем составила 78,33% (таблица 6.3.1).

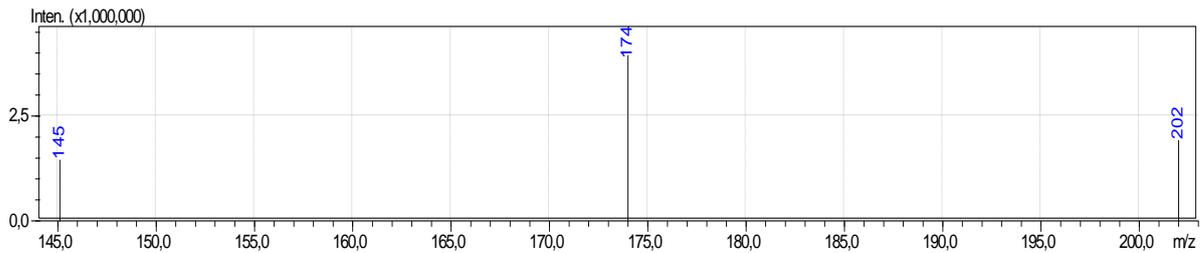
**Таблица 6.3.1 – Степень извлечения фенотропила из плазмы крови методом ЖЖЭ**

Исходная концентрация фенотропила в модельной смеси, мкг/мл	Степень экстракции, %	Метрологические характеристики (n=6)
5 мкг/мл	81,14	$X_{cp.} = 78,33$ $SD = 3,40$ $RSD = 4,34$
	78,67	
	74,98	
	80,59	
	73,32	
	81,25	

Следующим этапом разработки стал выбор условий детектирования фенотропила методом ВЭЖХ-МС/МС, поскольку данная информация в литературе отсутствует. Нами были получены масс-спектры фенотропила в режиме положительной ионизации при использовании подвижной фазы ацетонитрил: вода (рис.6.3.1 – 6.3.2).



**Рисунок 6.3.1 – Масс-спектр фенотропила 1 порядка, снятый в режиме положительной ионизации**



**Рисунок 6.3.2 – Масс-спектр фрагментных ионов фенотропила**

Установлено, что масс-спектр фенотропила характеризуется наличием интенсивного иона с массовым числом ( $m/z$ ) 218 (материнский ион). При фрагментации материнского иона был получен масс-спектр второго порядка, содержащий 3 иона с  $m/z$  174, 202 и 145 (дочерние). Поскольку наибольшей интенсивностью обладает ион 174, для дальнейшего детектирования фенотропила в режиме МРМ был выбран переход  $218 \rightarrow 174$ . Оптимизированная энергия соударений (СЕ) для данного перехода составила – 13 эВ.

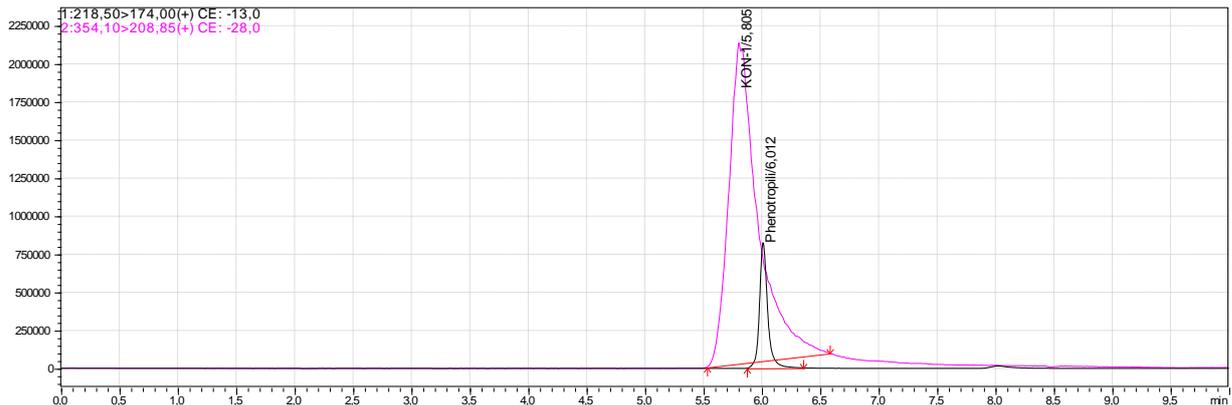
По результатам проведенных исследований нами разработана методика количественного определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови, включающая в себя пробоподготовку методом жидкость-жидкостной экстракции и анализ извлечения методом ВЭЖХ-МС/МС.

*Условия жидкость-жидкостной экстракции:*

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 хлористоводородной 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 (п. 6.1). Детектирование образующихся ионов осуществляют в режиме МРМ, используя ионные переходы 354 → 209 (для КОН-1) и 218 → 174 (для фенотропила).

Пример хроматограммы извлечения из модельной смеси плазмы крови представлен на рисунке 6.3.3.

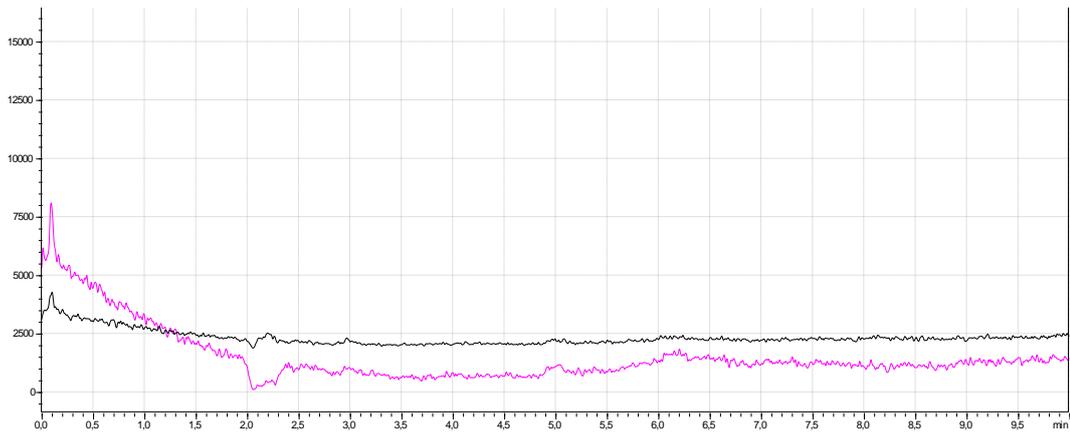


**Рисунок 6.3.3 – Хроматограмма экстракта из модельной смеси плазмы крови (содержание КОН-1 9,2 мкг/мл; фенотропил 1 мг/мл)**

В данных условиях фенотропил элюируется симметричным пиком со временем удерживания 5,9 мин.

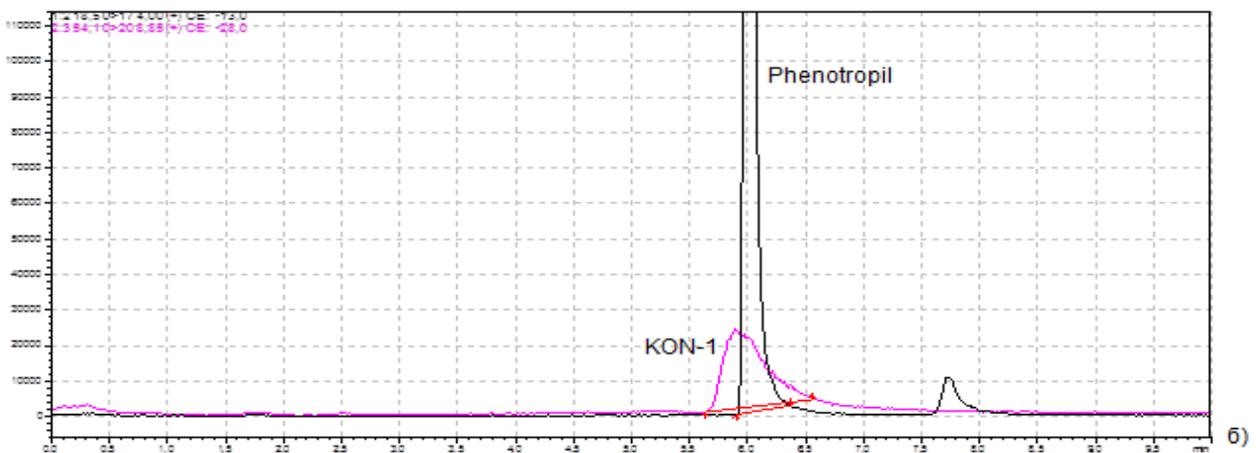
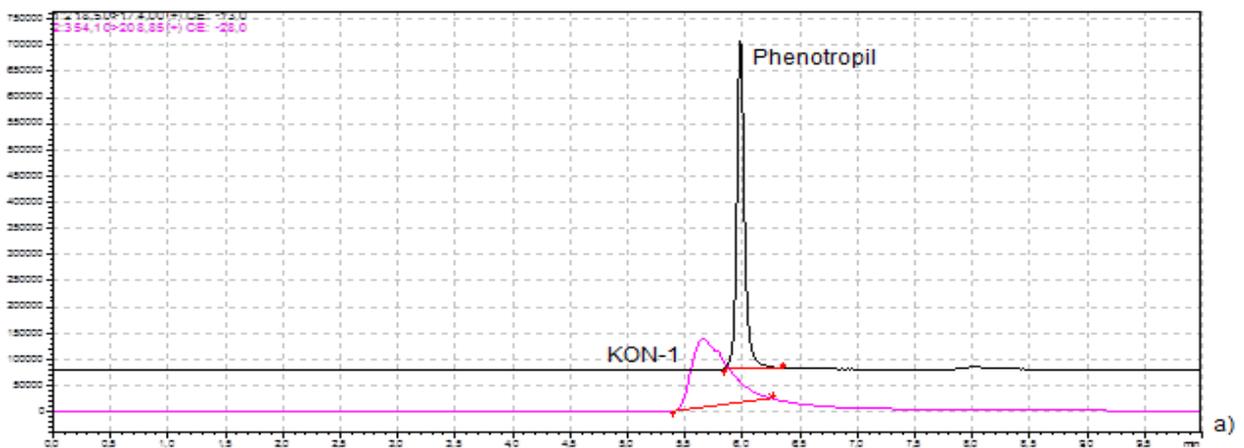
#### **6.4. Валидация методики количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС**

При оценке **селективности** предлагаемой биоаналитической методики были проанализированы извлечения из «холостой» плазмы (рис. 6.4.1), а также модельных образцов плазмы с известным содержанием КОН-1 (рис. 6.4.2).



**Рисунок 6.4.1 - Хроматограмма экстракта «холостой» плазмы**

На хроматограммах экстрактов интактной плазмы отсутствовали пики, совпадающие по времени удерживания с пиками анализируемого вещества и внутреннего стандарта.



**Рисунок 6.4.2 - Хроматограммы извлечений из модельных образцов плазмы**

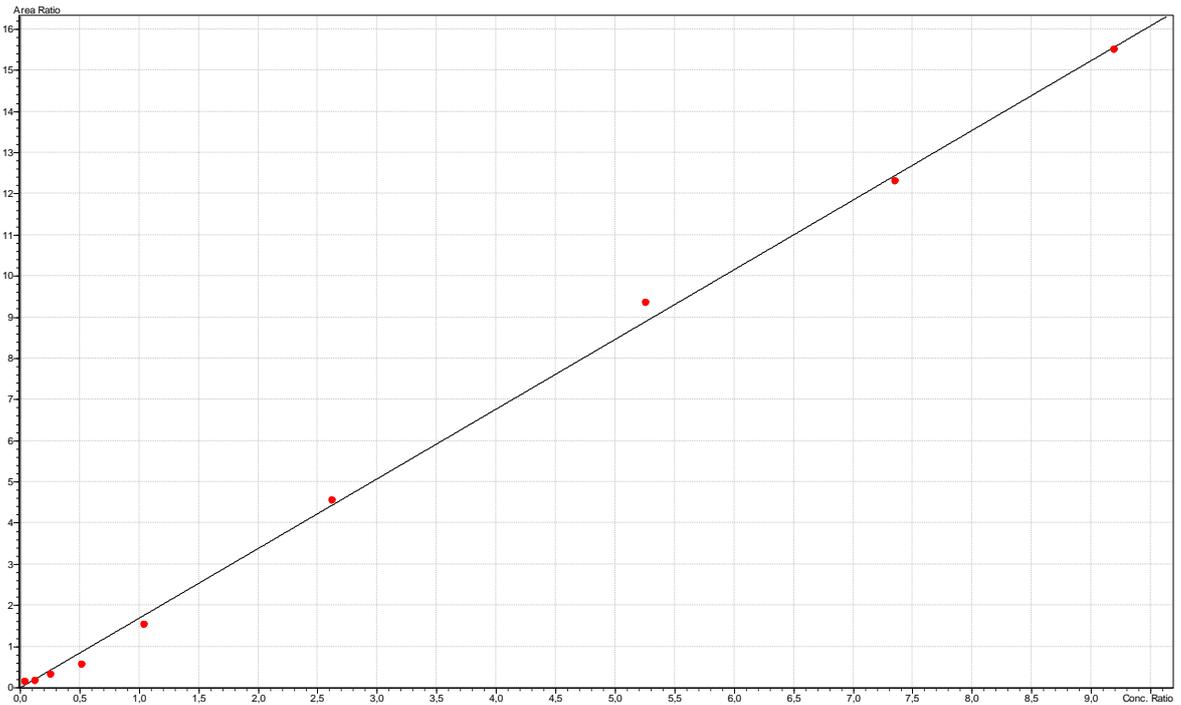
**а) концентрация КОН-1 в модельной смеси (500 нг/мл)**

**б) концентрация КОН-1 в модельной смеси на уровне ПКО (40 нг/мл)**

Для установления **линейности методики** были проанализированы 9 модельных образцов плазмы с содержанием КОН-1 в диапазоне от 43 до 9200 нг/мл (табл. 6.4.1). Калибровочный график представлен на рис. 6.4.3. Уравнение калибровочного графика имеет вид  $Y = 1,69328 \times C$ ; где  $Y$  – соотношение площадей,  $C$  – концентрация. Коэффициент корреляции  $R^2$  составил 0,9986041, что свидетельствует о линейности методики в указанном диапазоне концентраций.

**Таблица 6.4.1 - Данные для построения калибровочного графика количественного определения КОН-1**

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Соотношение площадей КОН-1 и внутреннего стандарта (среднее значение 3 определений)
43	0,129797
130	0,162790
263	0,314746
526	0,542624
1050	1,53001
2630	4,54917
5260	9,33777
7360	12,2963
9200	15,4897



**Рисунок 6.4.3 - Калибровочный график количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС**

Отклонения концентраций калибровочных стандартов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений представлены в таблице 6.4.2.

**Таблица 6.4.2 – Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений**

$C_{\text{факт.}}, \text{НГ}$	<b>43</b>	<b>130</b>	<b>260</b>	<b>530</b>	<b>1050</b>	<b>2630</b>	<b>5260</b>	<b>7360</b>	<b>9200</b>
$C_{\text{рассчит.}}, \text{НГ}$	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%							

Относительная погрешность рассчитанной концентрации от фактической для образца, соответствующего ПКО, не превышает 20%, для остальных точек – 15%, что соответствует современным требованиям.

Для оценки методики по показателям «Прецизионность» и «Правильность» готовили по 6 модельных биообразцов на 5 уровнях концентраций КОН-1: 36; 110; 530; 1230; 3680; 6690 нг/мл. Подготовку образцов для анализа осуществляли в соответствии с описанной методикой. Прецизионность и правильность методики оценивалась по величинам относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной погрешности ( $\delta$ ,%), соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 6.4.3.

**Таблица 6.4.3 – 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	$\bar{X}$ (n = 6)	SD	RSD, %	$\delta$ , %
1	2	3	4	5	6
36	37	38	3,16	8,32	5,5
	43				
	38				
	40				
	34				
	36				
110	92	102	11,08	10,86	-7,3
	99				
	108				
	120				
	90				
	103				
530	473	529	67,48	12,76	-1,2
	518				
	600				
	429				
	571				
	581				

1	2	3	4	5	6
1230	1168	1192	92,62	7,77	-3,1
	1073				
	1295				
	1259				
	1098				
	1257				
3680	3086	3509	337,13	9,61	- 4,8
	3588				
	3679				
	3123				
	3632				
	3945				
6690	5699	6663	714,91	10,73	- 0,4
	7146				
	6949				
	5806				
	7293				
	7087				

Полученные результаты контроля не превышают 15%, допускаемых для биоаналитических методик, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических ошибок в результатах анализа.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. На стандартных растворах определены оптимальные условия хроматографического анализа биологически активного соединения КОН-1 в режиме обращенно-фазной сверхэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что удовлетворительная форма пика вещества достигается при использовании градиентного элюирования в системе ацетонитрил: вода.
2. Изучены процессы ионизации и характер фрагментации КОН-1 в условиях ВЭЖХ-МС/МС и определены условия его детектирования в режиме регистрации ионных переходов (MRM). Установлено, что оптимальным с точки зрения чувствительности определения является переход  $354 \rightarrow 209$ .
3. Выбран оптимальный способ пробоподготовки плазмы крови к хроматомасс-спектрометрическому определению КОН-1. В эксперименте доказано, что извлечения из биологического образца, полученные путем жидкость-жидкостной экстракции, содержат меньшее количество эндогенных соэкстрактивных веществ по сравнению с методом прямого осаждения, что существенно минимизирует «матричный» эффект.
4. В качестве внутреннего стандарта для расчета количественного содержания КОН-1 в извлечениях из плазмы крови рекомендован фенотропил. Установлено, что данное вещество эффективно извлекается из биожидкости (более 78%) и определяется в условиях, разработанных для КОН-1. Исходя из анализа полученных масс-спектров (1 и 2 порядка) фенотропила определен ионный переход для его масс-спектрометрического детектирования ( $218 \rightarrow 174$ ).
5. Проведенная валидационная оценка разработанной методики доказала ее селективность, линейность в широком диапазоне концентраций (коэффициент корреляции составил более 0,998), прецизионность и правильность (значения коэффициента вариации и величины относительной погрешности не превышают 15%).

*Результаты проведенных исследований (Глава 6) отражены в публикации:*

1. 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.

## ГЛАВА 7. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОН-1

### 7.1. Изучение экскреции КОН-1 из организма крыс

Экскрецию КОН-1 из организма животных изучали на белых крысах-самцах линии Вистар массой 300-400 г. Животные содержались в виварии Пермской фармацевтической академии в стационарных условиях при естественном световом режиме на стандартном рационе. За 20 ч до начала эксперимента животных лишали пищи. Субстанцию КОН-1 вводили однократно перорально в суспензии крахмальной слизи в дозе 100 мг/кг. Животных помещали в метаболическую камеру, мочу собирали через 24, 48 и 72 часа после введения субстанции, измеряя ее объем. Параллельно исследования проводили и в контрольной группе, которым вводили суспензию крахмальной слизи без добавления вещества.

Количественное определение КОН-1 в моче осуществляли согласно разработанной методике (п. 5.1 диссертации). Результаты эксперимента представлены в таблицах 7.1.1 – 7.1.2.

**Таблица 7.1.1 – Результаты изучения экскреции КОН-1 с мочой после однократного перорального введения крысам в дозе 100 мг/кг**

Масса крысы, г	Доза введенного вещества, мг	Период времени сбора мочи, ч	Объем мочи, мл	Содержание КОН-1 в моче, мг	% от введенной дозы
1	2	3	4	5	6
320	32	0 – 24	17	1,61	5,0
		24 – 48	15	0,12	0,4
		48 – 72	18	не обн.	-
					Итого <b>5,4</b>
400	40	0 – 24	19	1,14	2,9
		24 – 48	22	0,22	0,6
		48 – 72	16	не обн.	-
					Итого <b>3,5</b>
1	2	3	4	5	6

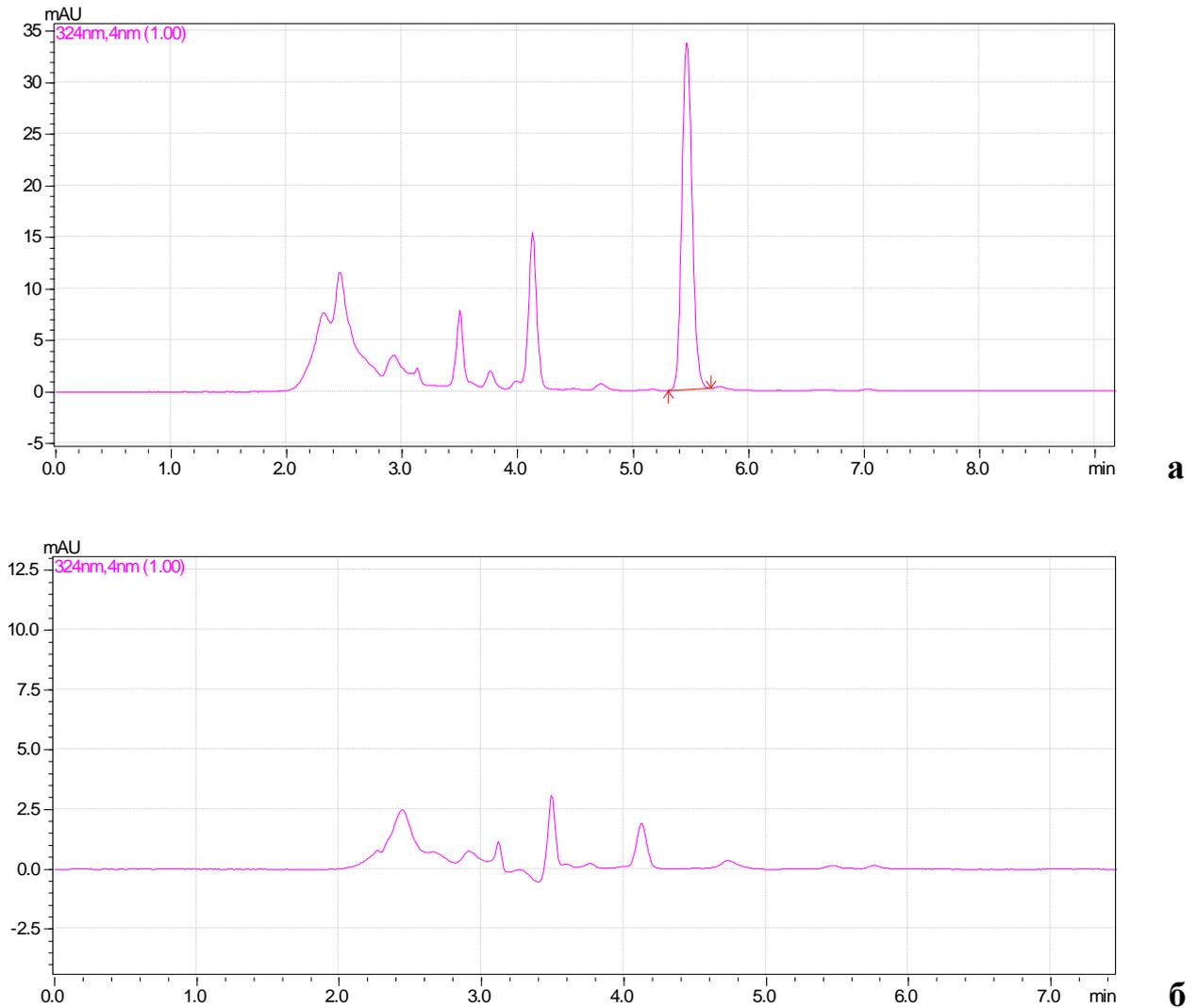
370	37	0 – 24	21	1,76	4,7
		24 – 48	19	0,18	0,5
		48 – 72	22	не обн.	-
					Итого <b>5,2</b>
340	34	0 – 24	14	1,99	5,8
		24 – 48	16	0,45	1,3
		48 – 72	18	не обн.	-
					Итого <b>7,1</b>
350	35	0 – 24	17	1,48	4,2
		24 – 48	18	0,27	0,8
		48 – 72	20	не обн.	-
					Итого <b>5,0</b>
340	34	0 – 24	24	1,63	4,8
		24 – 48	18	0,23	0,7
		48 – 72	21	0,02	0,06
					Итого <b>5,6</b>

**Таблица 7.1.2 – Усредненные данные по результатам изучения экскреции КОН-1 из организма крыс с мочой**

<b>Период времени сбора мочи, ч</b>	<b>0 – 24</b>	<b>24 – 48</b>	<b>48 – 72</b>	<b>0 – 72</b>
<b>% от введенной дозы, X<sub>сред.</sub> ± SD (n = 6)</b>	4,57 ± 0,97	0,72 ± 0,32	0,01 ± 0,02	5,30 ± 1,16

В ходе эксперимента 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.

Примеры хроматограмм экстрактов из мочи крыс после введения КОН-1 и интактной крысы (контрольная проба) представлены на рисунке 7.1.



**Рисунок 7.1 – Хроматограммы экстрактов из мочи крысы после 24 часов после введения субстанции (а) и интактной крысы (б)**

Установлено, что на хроматограммах экстрактов из мочи крыс после введения субстанции КОН-1 отсутствуют дополнительные пики (кроме пика исследуемого вещества) в сравнении с экстрактами мочи интактных животных, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии метаболических превращений КОН-1.

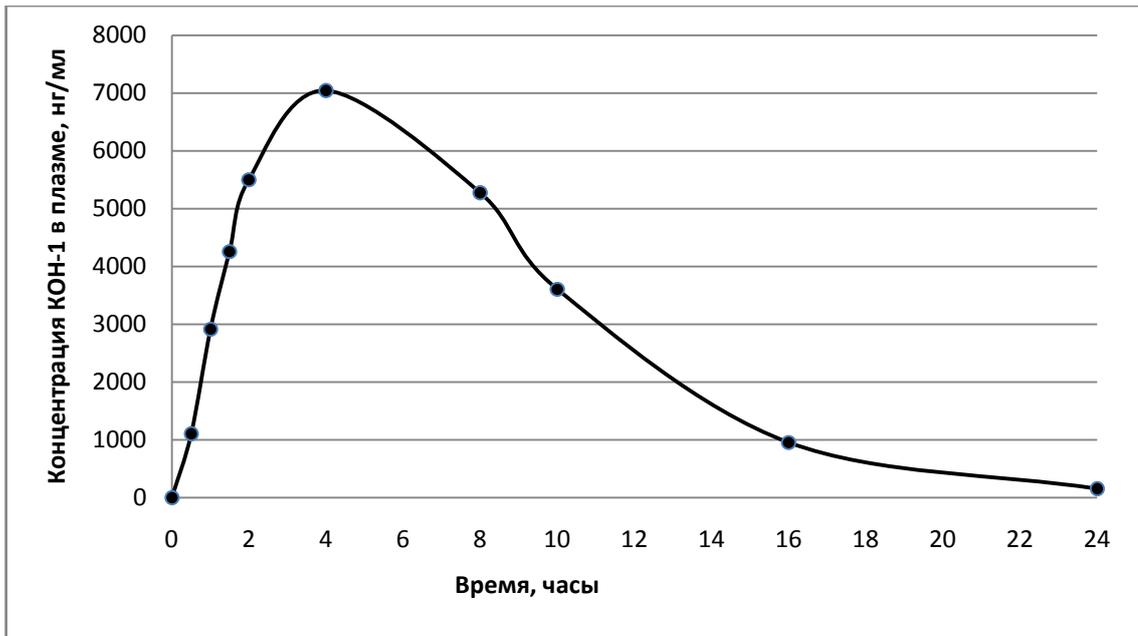
## 7.2. Изучение фармакокинетики КОН-1 на кроликах

Исследование фармакокинетики КОН-1 проводили на кроликах породы Шиншилла обоего пола, массой 2,5 - 3,5 кг. Перед началом введения у кроликов из ушной вены забирали пробы крови для получения интактной плазмы. Вещества вводили перорально в суспензии крахмальной слизи в дозе 100 мг/кг. Кровь отбирали через дискретные интервалы времени (0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 16,0; 24,0 ч) из ушной вены в пробирки с антикоагулянтом (гепарин натрия). Пробирки центрифугировали при охлаждении до 5°C в течение 10 мин при 5000 об/мин. Плазму отделяли и осуществляли анализ согласно разработанной методике, описанной в п. 5.2 диссертации.

Данные о динамике изменения концентраций КОН-1 в плазме кроликов во времени после однократного введения субстанции представлены в таблице 7.2.1 и рис. 7.2.1.

**Таблица 7.2.1 - Концентрация КОН-1 (нг/мл) в плазме крови кроликов после однократного перорального введения в дозе 100 мг/кг**

№	Время, часы									
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	4,0	8,0	10,0	16,0	24,0
1	0	866	2579	3675	4536	8960	6622	3679	977	93
2	0	2251	2672	3627	4157	4912	3044	2134	566	159
3	0	416	3428	6229	6444	10785	8687	7034	1868	134
4	0	749	2906	4195	7648	6862	4209	2864	761	195
5	0	1738	3276	4262	6003	5795	5394	3715	987	213
6	0	602	2648	3569	4226	4930	3685	2219	589	118
Среднее значение	<b>0</b>	<b>1104</b>	<b>2918</b>	<b>4260</b>	<b>5502</b>	<b>7041</b>	<b>5274</b>	<b>3608</b>	<b>958</b>	<b>152</b>
SD	-	725	357	1010	1422	2378	2103	1812	481	46
RSD, %	-	65,67	12,23	23,71	25,85	33,77	39,87	50,22	50,21	30,26



**Рисунок 7.2.2 - Динамика изменения концентрации КОН-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения**

На основе полученных данных были рассчитаны основные фармакокинетические параметры КОН-1:  $C_{\max}$  (максимальная плазменная концентрация);  $T_{\max}$  (время достижения максимальной концентрации),  $AUC_{0 \rightarrow t}$  (площадь под кривой «плазменная концентрация - время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке  $t$ );  $AUC_{0-\infty}$  (площадь под кривой «плазменная концентрация - время» с момента приема до бесконечности);  $k_{el}$  (константа скорости элиминации);  $T_{1/2}$  (период полувыведения из плазмы крови);  $MRT$  (среднее время удержания соединения в крови) (таблица 7.2.2).

Установлено, что исследуемое соединение хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, максимальная концентрация КОН-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения достигается через 3,3 часа и в среднем составляет 7206 нг/мл.

**Таблица 7.2.2 - Фармакокинетические параметры КОН-1 после однократного перорального введения кроликам в дозе 100 мг/кг**

	$AUC_{0 \rightarrow t}$ , нг/мл×ч	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ , нг/мл×ч	$T_{max}$ , ч	$C_{max}$ , нг/мл	$k_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч	$C_{max}/$ $AUC_{0 \rightarrow t}$
1 кролик	86059	86760	4,0	8960	0,26	2,67	6,72	0,10
2 кролик	51524	52518	4,0	4912	0,18	3,85	6,24	0,10
3 кролик	128717	129370	4,0	10785	0,26	2,67	7,19	0,08
4 кролик	70975	71969	2,0	7648	0,18	3,85	6,21	0,11
5 кролик	76919	78061	2,0	6003	0,20	3,47	6,78	0,08
6 кролик	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

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 7

1. Разработанные методики количественного определения КОН-1 в биологических жидкостях апробированы при фармакокинетических исследованиях субстанции на лабораторных животных.
2. Установлено, что при однократном пероральном введении субстанции КОН-1 крысам в дозе 100 мг/кг за первые 24 часа с мочой экскретируется незначительное количество неизмененного соединения (в среднем 4,57 % от введенной дозы). За вторые сутки выводится 0,72 % вещества.
3. При пероральном введении субстанции КОН-1 кроликам установлено, что исследуемое соединение быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, время достижения максимальной концентрации в плазме составляет 3,3 часа. По результатам эксперимента определены основные фармакокинетические параметры КОН-1 в плазме крови кроликов.

*Результаты проведенных исследований (Глава 7) отражены в публикациях:*

1. 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.

2. 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.

## 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 (pH7) (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 соответствии 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 pH 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.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Андреев, Б. В. Ноотропные средства / Б. В. Андреев // Мир Медицины. – 1998. – № 8. – С. 25 – 28.
2. Антонова, М. И. Экспериментальная фармакокинетика фенотропила: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.02 / Антонова Марита Ивановна – Москва, 2005. – 24 с.
3. Ахапкина, В. И. Отличительные особенности оригинально-инновационного состава Фенотропил или (RS)-2(2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)ацетамид, обладающего модуляторной активностью с соразмерным влиянием / В. И. Ахапкина // Поликлиника. – 2013. – № 4. – С. 43 – 58.
4. Белиничев, И. Ф. Ноотропная терапия: настоящее, прошлое, будущее / И. Ф. Белиничев, И. А. Мазур, В. Р. Стец // Международный неврологический журнал. – 2004. – № 15 (155). – С. 3 – 38.
5. Борисова, Е. О. Основы фармакокинетики лекарственных средств / Е.О. Борисова // Справочник поликлинического врача. – 2014. – № 6. – С. 44 – 51.
6. Бурчинский, С. Г. Высокодозовые лекарственные формы пирацетама: возможности и перспективы применения / С. Г. Бурчинский // Здоровье Украины. - 2009. - № 5 (89) – С. 28 – 29.
7. Бурчинский, С. Г. Новые подходы к ноотропной фармакотерапии и фармакопрофилактике / С. Г. Бурчинский // Украинский вестник психоневрологии – 2008. – Том 16, вып. 2. – С. 97 – 101.
8. Бурчинский, С. Г. Новые подходы к фармакотерапии когнитивных и депрессивных расстройств при психосоматической патологии / С. Г. Бурчинский // Международный неврологический журнал. – 2010. – № 3(33). – С. 129 – 132.
9. Бурчинский, С. Г. Пирацетам: новые открытия – новые возможности в клинической практике [Электронный ресурс] / С. Г. Бурчинский // [www.health-medix.com](http://www.health-medix.com). 2013. – № 1 (97). – С. 35 – 39. – Режим доступа: <http://www.health-medix.com/articles/misteztvo/2013-02-20/piracetam.pdf>. Дата обращения: 24.07.2015 г.

10. Воронина, Т. А. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы / Т. А. Воронина, С. Б. Середенин // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1998. – Т. 61, № 4. – С. 3 – 9.
11. Воронина, Т. А. Гипоксия и память. Особенности эффектов и применения ноотропных препаратов / Т. А. Воронина // Вестник РАМН. – 2000. – № 9. – С. 27 – 34.
12. Воронина, Т. А. Ноотропные и нейропротекторные средства / Т. А. Воронина, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70, № 4. – С. 44 – 58.
13. Выбор условий хроматографического разделения специфических примесей в субстанциях соединений из группы производных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева [и др.] // Актуальные проблемы науки фарм. и мед. ВУЗов: от разработки до коммерциализации: материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Перм. гос. фарм. акад. – Пермь, 2011. – С. 97 – 101.
14. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор) [Электронный ресурс] / Ю. В.Медведев [и др.] // Аналитические решения. Markets and Applications Programs. – 2013. – 8 с. – Режим доступа: [http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2995RURU\\_print.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2995RURU_print.pdf). Дата обращения 17.03.2016 г.
15. Гейн, В. Л. Синтез и свойства 1-замещенных 5-арил-4-ацетил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов // В. Л. Гейн, Л. Ф. Гейн, Н. Ю. Порсева // Петербургские встречи: симп. по органич. химии. 21-24 мая Санкт- Петербург. – Санкт-Петербург, 1995. – С.188 – 189.
16. Гейн, Л. Ф. Синтез, химические свойства и биологическая активность 1,4-дизамещенных 5-арил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов: автореф. дис. д-ра фарм. наук: 15.00.02 / Гейн Людмила Федоровна – Пермь, 2009. – 52 с.
17. Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] – 13-е изд. – Том I. – Москва, 2015. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.

18. Дзяк, Л. А. Опыт применения нового ноотропного препарата Прамистар в лечении мнестических расстройств у больных с цереброваскулярной патологией / Л. А. Дзяк, В. А. Голик, Е. В. Мизякина // Лікар. справа. – 2003. – № 8. – С. 67 – 72.
19. Евтушенко, И. С. Ноотропы и нейропротекторы в современной клинической нейрофармакологии / И. С. Евтушенко // Международный неврологический журнал. – 2013. – № 3(37). – С. 20 – 27.
20. Изучение реакции КОН-1 с раствором железа (III) хлорида в применении к его количественному определению / О. Н. Кляшева [и др.] // Вестн. Перм. гос. фармац. акад. – 2010. – № 6. – С. 134 – 135.
21. Калюжка, В. Ю. Действие ролипрама на когнитивные функции / В. Ю. Калюжка, Н. А. Маркевич // Сборник тезисов межвузовской конференции молодых ученых для студентов: Медицина третьего тысячелетия. – Харьков, 2015. – С. 274.
22. Карпенко, Ю. Н. Разработка и валидация методики определения посторонних примесей в субстанции биологически активного соединения КОН-1 [Электронный ресурс] / Ю. Н. Карпенко, О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина // «Современные проблемы науки и образования». – 2013. – № 3. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9618>.
23. Кляшева, О. Н. Определение нового биологически активного соединения КОН-1 алкалиметрическим и спектрофотометрическим методами / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина // Молодая фармация – потенциал будущего: тез. II Всерос. науч. конф. студентов и аспирантов с междунар. участием. 18–19 апр. 2012 г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2012. – Ч.1. – С. 58 – 59.
24. Кляшева, О. Н. Разработка методик доказательства подлинности и определения доброкачественности нового биологически активного соединения КОН-1 / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина, В. Л. Гейн // Фармация и общественное здоровье: материалы V междунар. науч.-практ. конф., 18 апр. 2012 г., Екатеринбург. – Екатеринбург, 2012. – С. 91 – 92.

25. Кляшева, О. Н. Разработка методик анализа и стандартизация нового биологически активного соединения КОН-1, проявляющего ноотропное действие: автореф. дис. канд. фарм. наук: 14.04.02 / Кляшева Ольга Николаевна – Пермь, 2014. – 21 с.
26. Кляшева, О. Н. Разработка методов оценки качества субстанции нового биологически активного соединения КОН-1 / О. Н. Кляшева [и др.] // Фармация. – 2012. – № 5. – С. 8 – 10.
27. Кляшева, О. Н. Спектрофотометрия в видимой области в количественном анализе новых биологически активных соединений из группы производных 3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева, К. В. Ван, Т. И. Ярыгина // Молодежная конференция «Международный год химии»: сб. материалов. – Казань, 2011. – С. 61 – 62.
28. Количественный анализ фенотропила в биологических объектах методом газожидкостной хроматографии / М. И. Антонова [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т. 37, № 10. – С. 46 – 47.
29. Кылосова, И. А. Синтез, свойства и биологическая активность 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-карбоксиалкил-3-пирролин-2-онов и их функциональных производных: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.02 / Кылосова Инна Александровна – Пермь, 2007. – 20 с.
30. Леветирацетам: инструкция, применение и формула [Электронный ресурс] / Справочник лекарств РЛС: Регистр лекарственных средств России. – Режим доступа: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_3156.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_3156.htm). Дата обращения: 11.08.2015 г.
31. Лесиовская, Е. Е. Сравнительная характеристика лекарственных средств, стимулирующих ЦНС. Ноотропные препараты / Е. Е. Лесиовская, Н. В. Марченко, А. С. Пивоварова // ФАРМиндекс: Практик. – 2003. – Вып. 4.
32. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье – Москва: Химия, 1971. – С. 238.

33. Мамчур, В. И. Фиксированные комбинации церебропротекторов: мнение фармаколога / В. И. Мамчур, С. Н. Дронов, В. И. Жилюк // Здоров'я України. – 2007. – № 6/1. – С. 49 – 50.
34. Меньшикова, Л. А. Особенности фармакокинетических исследований инновационных лекарственных препаратов / Л. А. Меньшикова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. - № 1 (6). – С. 104 – 108.
35. Ноотропил в свете современных исследований (анализ зарубежных исследований) / А.С. Аведисова [и др.] // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2000. – Т. 2, № 6. – С. 178 – 184.
36. Ноотропные препараты – нейропептиды в лечении неврологических расстройств у детей / О. В. Глоба [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 4 – С. 51 – 52.
37. Прамистар в терапии когнитивных и эмоционально-волевых нарушений при цереброваскулярной патологии [Электронный ресурс] / В. А. Малахов [и др.] // Международный неврологический журнал. – 2011. – 5(43). Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/21562>.
38. Разработка методик доказательства подлинности производных 3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева [и др.] // Сб. материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 75-летию со дня рождения В. В. Кормачева «Современные проблемы химической науки и образования». – Чебоксары, 2012. – Т. 2. – С. 140 – 142.
39. Разработка спектрофотометрической методики определения 3-амино-1-пропанола в применении к анализу 4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева [и др.] // Актуальные проблемы науки фарм. и мед. ВУЗов: от разработки до коммерциализации: материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Перм. гос. фарм. акад. – Пермь, 2011. – С. 94 – 97.
40. Разработка хроматографического метода количественного определения фенибута в биологических пробах / И. Н. Тюренков [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2010. – Т. 44, № 12. – С. 53 – 55.

41. Рацетамы: методы синтеза и биологическая активность: монография / В. М. Брестовская [и др.] – Санкт-Петербург: Астерион, 2016. – 287 с.
42. Рейхарт, Д. В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях (обзор) / Д. В. Рейхарт, В. В. Чистяков // Казанский медицинский журнал. – 2010 г. – Т. 91, № 4. – С. 532 – 536.
43. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». – 2016. – 57 с.
44. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов [и др.]. - Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
45. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том первый / А. Н. Миронов [и др.]. - Москва: Гриф и К, 2013. – 328 с.
46. Смирнова, Л. А. Разработка метода количественного определения нового производного гамма-аминомасляной кислоты в биологических пробах / Л. А. Смирнова [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 17 – 18.
47. Стасюк, О. Н. Оценка фармакологической активности ноотропов по показателям поведенческой реакции у крыс / О. Н. Стасюк, Н. Д. Авсеенко, Е. В. Альфонсова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1 - 2. – С. 384 – 387.
48. Степанюк, В. В. Ноотропные препараты / В. В. Степанюк // Фармаскоп. - № 12(33). – 2005. – С. 22 – 25.
49. Сычев, Д. А. Пирацетам и пирацетамоподобные препараты: взгляд клинического фармаколога / Д. А. Сычев, К. В. Герасимова, В. А. Отделенов // Русский медицинский журнал. Неврология. Психиатрия. – 2011. - № 15. – С. 957 – 963.
50. Тарарощенко, Н. В. Актуальность применения прамирацетама в практике врача-невролога / Н. В. Тарарощенко // Здоров'я України. – 2008. – № 18. – С. 49 – 51.

51. Титова, А. В. Методы выделения токсических органических соединений из биологического материала, используемые в судебно-химическом анализе / А. В. Титова // Фармация. – 1989. – № 1. – С. 80 – 83.
52. Титова, Н. В. Современный взгляд на ноотропную терапию / Н. В. Титова // Неврология. Психиатрия. 2007. – Т. 15, № 24. – С. 1846 – 1850.
53. Уварова, Ю. П. Рынок ноотропных препаратов / Ю. П. Уварова // Ремедиум. – 2010. – № 3. – С. 20 – 21.
54. Улезко, А. В. Психотропные средства в психиатрической практике / А. В. Улезко, Ю. В. Платонова. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. – 176 с.
55. Фармакокинетика гимантана у крыс / Е. А. Литвин [и др.] // Эксперим. и клин. фармакологии. – 2011. – № 11. – С. 24 – 28.
56. Фармакокинетика нового потенциального дипептидного ноотропного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс / С. С. Бойко [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 2001. – № 9. – С. 11 – 13.
57. Фармакокинетика ноопепта после внутривенного введения лиофилизированной лекарственной формы у крыс / С. С. Бойко [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2007. – Т. 41, № 3. – С. 7 – 8.
58. Фармакологическая группа – ноотропы [Электронный ресурс] // Справочник лекарств РЛС: Регистр лекарственных средств России. - Режим доступа: [http://www.rlsnet.ru/fg\\_index\\_id\\_46.htm](http://www.rlsnet.ru/fg_index_id_46.htm). Дата обращения 17.12.2017 г.
59. Федорова, Г. А. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине / Г. А. Федорова, Л. А. Кожанова, Е. М. Полянская // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – № 1 (23). – С. 35 – 41.
60. Штрыголь, С. Ю. Побочные эффекты ноотропных средств [Электронный ресурс] / С. Ю. Штрыголь, Т. В. Картунова, Д. В. Штрыголь // Провизор. – 2003. – вып. 11. – Режим доступа: [http://provisor.com.ua/archive/2003/N11/art\\_31.php](http://provisor.com.ua/archive/2003/N11/art_31.php). Дата обращения 17.12.2013 г.

61. Шуклина, Н. С. Поиск соединений, обладающих ноотропной активностью, в ряду 3-пирролин-2-онов: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 14.00.25 / Шуклина Наталья Сергеевна. – Пермь, 2001. – 21 с.
62. Ярошенко Д. В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии: автореф. дис. ...канд. хим. наук: 02.00.02 / Ярошенко Дмитрий Вадимович – Санкт-Петербург, 2014. – 24 с.
63. A placebo controlled study of the propentofylline added to risperidone in chronic schizophrenia / S. Salimi S [et al.] (April 2008). // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2008 - № 32 (3) – P. 726 – 732.
64. Absorption and disposition of <sup>14</sup>C-labelled oxiracetam in rat, dog and man / H.P. Gschwind [et al.] // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 17 (1992). – P. 67 – 82.
65. Anticonvulsant and neuroprotective effects of the novel nootropic agent nefiracetam on kainic acid-induced seizures in rats / Y. Kitano [et al.] // *Brain Research*. – 2005. – 1057(1-2). – P. 168 – 176.
66. Bakhtiar, R. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry / R. Bakhtiar, T. K. Majumdar // *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007. - 55[3]:26278.
67. Biotransformation of a new pyrrolidinone cognitionenhancing agent: isolation and identification of metabolites in human urine / Y. Fujimaki [et al.] // *Xenobiotica*. – 1990. – 20. – P. 1081 – 1094.
68. Black, A. Metabolic disposition of rolziracetam in laboratory animals / A. Black, T. Chang // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 1987. – 12. – P. 135 – 143.
69. Bruno, J. R. Chemistry and Pharmacology of nootropics / J. R. Bruno // *Drug development research*. – 1982. – P. 463 – 474.
70. Cai, S. Determination of aniracetam's main metabolite, N-anisoyl-GABA, in human plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study / S. Cai, L.

Wang // Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. – 2012. – 897:50-4. – doi: 10.1016/j.jchromb.2012.04.007.

71. Chang, T. Gas chromatographic assay of pramiracetam in human plasma using nitrogen specific detection / T. Chang, R. M. Young // J. Chromatogr. - 274(1983). – P. 346-349.

72. Chang, T. Metabolic disposition of pramiracetam in rhesus monkeys and rats / T. Chang, R. M. Young // Pharmacologisr. – 1982. – 26. – P. 95 – 109.

73. Chromatographic separation of piracetam and its metabolite in a mixture of microsomal preparations, followed by an MS/MS analysis / Kapendra Sahu [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – 65. – P. 94 – 101.

74. Chrościńska-Krawczyk, M. Briveracetam and Seletacetam – two new third-generation antiepileptic drugs / M. Chrościńska-Krawczyk, M. Jasiński // Praca Pogladowa. – 2012. – 21. – P. 65 – 68.

75. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material / A.C. Moffat [et al.]. – London: The pharmaceutical press, 1986. – 1684 p.

76. Clinical effect of WEB 1881 (nebracetam fumarate) on patients with dementia of the Alzheimer type and study of its clinical pharmacology / K. Urakami [et al.] // Clinical Neuropharmacology. – 1993. – 16 (4). – 347 – 358.

77. Comparative kinetics of oxiracetam in serum and CSF of patients with dementia of Alzheimer type / L. Parnetti [et al.] // Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. – 1990. – 15. – P. 75 – 78.

78. Comparative pharmacokinetic studies of racemic oxiracetam and its pure enantiomers after oral administration in rats by a stereoselective HPLC method / Q. Zhang [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. –111 (2015). – P. 153 – 158. doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.039.

79. Curticepean, A. New validated method for piracetam HPLC determination in human plasma / A. Curticepean, S. Imre // Journal of biochemical and biophysical methods. – 2007. – 69 (3). – P. 273 – 281.

80. Delayed, post-injury treatment with aniracetam improves cognitive performance after traumatic brain injury in rats / A. I. Baranova [et al.] // *Journal of Neurotrauma* / - 2006. - 23(8). – P. 1233 – 1240.
81. Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of cognition-enhancing drugs / F. Gualtieri [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2002. – № 2. – P. 125 – 138.
82. Determination of oxiracetam in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection / R. C. Simpson [et. al.] // *Journal of Chromatography*. – 1993. – 631 (1-2). – P. 227 – 232.
83. Determination of oxiracetam in human serum and urine by high-performance liquid chromatography / M. Visconti [et. al.] // *Journal of chromatography*. – 1987. – 416. – P. 433 – 438.
84. Determination of piracetam in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetics / X. Wang [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 2010. - 24(10):1108-12. doi: 10.1002/bmc.1412.
85. Determination of piracetam in human plasma and urine by liquid chromatography / K. Louchahi [et al.] // *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*. – 1995. – 663 (2). – P. 385 – 389.
86. Development of a simple chromatographic method for the determination of piracetam in human plasma and its pharmacokinetic evaluation / K. Barkat [et al.] // *Drug research*. – 2014. – 64 (7). – P. 384 – 388.
87. Development of New Method for Simultaneous Analysis of Piracetam and Levetiracetam in Pharmaceuticals and Biological Fluids: Application in Stability Studies / A. S. Farhan [et al.] // *BioMed Research International*. – 2014. - vol. 2014, Article ID 758283, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/758283.
88. Doheny, M. H. A high-performance liquid-chromatographic microanalytical procedure for the rapid estimation of piracetam in plasma or cerebrospinal fluid / M. H. Doheny, M. T. O'Connell, P. N. Patsalos // *The journal of pharmacy and pharmacology*. – 1996. – 48 (5). – P. 514 – 516.

89. Effect of the novel high affinity choline uptake enhancer 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-N-(2,3-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrofuro[2,3-b]quinolin-4-yl)acetoamide on deficits of water maze learning in rats / T. Bessho [et al.] // *Arzneimittelforschung*. – 1996. – 46 (4). – P. 369 – 373.
90. Effects of acute doses of oxiracetam in the scopolamine model of human amnesia / L. Preda [et al.] // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1993. – 110 (4). – P. 421 – 426.
91. Effects of Nefiracetam, a novel pyrrolidone-type nootropic agent, on the amygdala-kindled seizures in rats / Y. Kitano [et al.] // *Epilepsia*. – 2005. – 46(10). – P. 1561 – 1568.
92. Fujimaki, Y. High-performance liquid chromatographic determination of a new nootropic, N-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)acetamide, in human serum and urine / Y. Fujimaki, K. Sudo, H. Tachizawa // *J. of chromatography*. – 1988. – 433. – P. 235 – 242.
93. Gouliaev, A. H. Piracetam and other structurally related nootropics / A. H. Gouliaev, A. Senning // *Brain research reviews*. – 1994. – 19. – P. 180 – 222.
94. Gualtieri, T. Cognitive enhancers and neuroprotectants / T. Gualtieri // *Brain Injury & Mental Retardation: Neuropsychiatry & Psychopharmacology*. – Lillincott, 2004. – P. 429 – 449.
95. Guenzi, A. Determination of aniracetam and its main metabolite, N-anisoyl-GABA, in human plasma by high-performance liquid chromatography / A. Guenzi, M. Zanetti // *Journal of Chromatography*. – 1990. – 530 (2). – P. 397 – 406.
96. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. Washington, DC, 2001. – 25 p.
97. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009. – 23 p.
98. Histological evidence for neuroprotective action of nebracetam on ischemic neuronal injury in the hippocampus of stroke prone spontaneously hypertensive rats /

M. N. Nakashima [et al.] // *The Japanese Journal of Pharmacology*. – 1995. – 67 (1). – P. 91 – 94.

99. Holmer, A. F. Survey finds 103 medicines in clinical testing for mental disorders / A. F. Holmer // *New Med. Develop. Mental Illnesses*. – 2000. – N. 6. – P. 1 – 16.

100. Iwasaki, K. Effect of nebracetam on the disruption of spatial cognition in rats / K. Iwasaki, Y. Matsumoto, M. Fujiwara // *The Japanese Journal of Pharmacology*. – 1992. – 58 (2). – P. 117 – 126.

101. Jindal, A. Type 4 phosphodiesterase enzyme inhibitor, rolipram rescues behavioral deficits in olfactory bulbectomy models of depression: Involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cAMP signaling aspects and antioxidant defense system / A. Jindal, R. Mahesh, S. Bhatt // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2015. – 132. – P. 20 – 32.

102. Lee, C. R. Aniracetam. An overview of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and a review of its therapeutic potential in senile cognitive disorders / C. R. Lee, P. Benfield // *Drugs and Aging*. – 1994. – 4(3). – P. 257 – 273.

103. Malykh, A. G. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders / A. G. Malykh, M. R. Sadaie // *Drugs*. – 2010. – 70 (3). – P. 287 – 312.

104. Mechanisms of action of cognitive enhancers on neuroreceptors / T. Narahashi [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2004. – 27 (11). – P. 1701 – 1706.

105. MKC-231, a choline-uptake enhancer: (1) long-lasting cognitive improvement after repeated administration in AF64A-treated rats / T. Bessho [et al] // *J Neural Transm*. – 2008. – 115 (7). – P. 1019 – 1025.

106. Muller, W. E. Piracetam: novelty in a unique mode of action / W. E. Muller, G. P. Eckert, A. Eckert // *Pharmacopsychiatry* – 1999. – V. 32, Suppl.1. – P. 2 – 9.

107. Nakamura, K. Anxiolytic effects of aniracetam in three different mouse models of anxiety and the underlying mechanism / K. Nakamura, M. Kurasawa // *European J. of Pharmacology*. – 2001. – 420(1). – P. 33 – 43.

108. Nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat cortical neurons / X. Zhao [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2001. – 59 (4). – P. 674 – 683.
109. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters / M. Biziuk [et al.] // *Journal of chromatography A*. - 1996. - Vol. 754, No. 1-2. – P. 103 – 123.
110. Ogiso, T. Pharmacokinetics of Aniracetam and Its Metabolites in Rats / T. Ogiso [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1998. – Vol. 87, No 5. – P. 594 – 598.
111. Oxiracetam antagonizes the disruptive effects of scopolamine on memory in the radial maze / M. Magnani [et al.] // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1992. - 106(2). – P. 175 – 178.
112. Oxiracetam in the treatment of multi-infarct dementia / B. Baumel [et al.] // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. –1989. – 13(5). – P. 673 – 682.
113. Oxiracetam pharmacokinetics following single and multiple dose administration in the elderly / E. Perucca [et al.] // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet*. – 12 (1987). – P. 145 – 148.
114. Pharmacokinetics and bioequivalence study of aniracetam after single-dose administration in healthy Chinese male volunteers / Y. Tian [et al.] // *Arzneimittel – Forschung*. – 2008. – 58(10). – P. 497 – 500.
115. Pharmacokinetics of NS-105, a novel cognition enhancer. 1st communication: absorption, metabolism and excretion in rats, dogs and monkeys after single administration of <sup>14</sup>C-NS-105 / H. Mukai [et al.] // *Arzneimittelforschung*. – 1999. – 49 (11). – P. 881 – 890.
116. Pharmacokinetics of NS-105, a novel cognition enhancer. 2nd communication: distribution and transfer into fetus and milk after single administration, and effects of repeated administration on pharmacokinetics and hepatic drug-metabolizing enzyme activities in rats / H. Mukai [et al.] // *Arzneimittelforschung*. – 1999. – 49 (12). – P. 977 – 985.

117. Pharmacokinetics of oral pramiracetam in normal volunteers / T. Chang [et al.] // *J. Clin. Pharmacol.* – 1985. – 25. – P. 291 – 295.
118. Pharmacokinetics of oxiracetam following intravenous and oral administration in healthy volunteers / E. Perucca [et al.] // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 1984. – 9. – P. 267 – 274.
119. Pharmacokinetics of oxiracetam in elderly patients after 800 mg oral doses, comparison with non-geriatric healthy subjects / J. B. Lecaillon [et al.] // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 15 (1990). – P. 223 – 230.
120. Pharmacological characteristics of a new phenyl analog of piracetam-4-phenylpiracetam / I. Bobkov [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 1983. – 95(4). – P. 50 – 53.
121. Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases / N. Kumar [et al.] // *BMC Medical Genetics.* – 2013. – doi: 10.1186/1741-7015-11-96.
122. Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease / A. Garcia-Osta [et al.] // *ACS Chemical Neuroscience.* – 2012. – 3(11). – P. 832 – 844.
123. Proinflammatory receptor switch from G $\alpha$ s to G $\alpha$ i signaling by  $\beta$ -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells / Z. Jenei-Lanzl [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity.* – 2015. – 1591(15). – P. 415 – 418.
124. Quantitative effects of nefiracetam on spatial learning of rats after cerebral embolism / D. T. Le [et al.] // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* – 2001. – 10(3). – P. 99 – 105.
125. Rapid quantitative analysis of oxiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry / J. Son [et al.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* – 2004. – 36 (3). – P. 657 – 661.
126. Rhoda, L. C. Aniracetam. An Overview of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and a Review of its Therapeutic Potential in Senile Cognitive Disorders / L. C. Rhoda, P. Benfield // *Drugs & Aging.* – 1994. – Vol. 4(3). – P. 257 – 273.
127. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: effect of vinpocetine / P. Bonoczk [et al.] // *Brain Res Bull.* – 2000. – № 53 (3). – P. 245 – 254.

128. Rolipram reduces excitotoxic neuronal damage / F. Block [et al.] // *Neuroreport*. – 2001. – № 12 – P. 1507 – 1511.
129. Roncari, G. Human Pharmacokinetics of Aniracetam / G. Roncari // *Drug Investigation*. – 1993. – Vol. 5(1). – P. 68 – 72.
130. Seletracetam (UCB 44212) / B. Bennett [et al.] // *Neurotherapeutics*. – 2007. – 4(1). – P. 117 – 122.
131. Sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of aniracetam in human plasma / J. Zhang [et al.] // *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2007 – 858 (1-2). – P. 129 – 134.
132. Simultaneous determination of nefiracetam and its metabolites by high-performance liquid chromatography / Y. Fujimaki [et al.] // *J. Chromatogr.* – 1992. – 575. – P. 261 – 268.
133. Simultaneous determination of piracetam and its four impurities by RP-HPLC with UV detection / M. S. Arayne [et al.] // *Journal Chromatography Science*. – 2010. – 48 (7) – P. 589 – 594.
134. Simultaneous determination of oxiracetam and its degraded substance in rat plasma by HPLC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study after a single high-dose intravenous administration / X. Wan [et al.] // *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2014. - 969:95-100. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.07.041.
135. Soltes, L. Effective One/Two Step Purification of Various Materials by Solid-phase Extraction / L. Soltes, B. Sebille // *Biomedical chromatography*. – 1997. – Vol. 11. – P. 348 – 351.
136. Synthesis and pharmacological activity of a series of dihydro-1H-pyrrolo[1, 2-a]imidazole-2,5(3H,6H)-diones, a novel class of potent cognition enhancers / M. Pinza [et al.] // *J Med Chem*. – 1993. – 36 (26). – P. 4214 – 4220.
137. Synthesis of 4-Aryl-2-pyrrolidones and  $\beta$ -Aryl- $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) Analogues by Heck Arylation of 3-Pyrrolines with Arenediazonium Tetrafluoroborates. Synthesis of ( $\pm$ )-Rolipram on a Multigram Scale and Chromatographic Resolution by

Semipreparative Chiral Simulated Moving Bed Chromatography / A. L. Garcia [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry* – 2005. – 70. – P. 1050 – 1053.

138. Tacconi, M. T. Piracetam: physiological disposition and mechanism of action / M. T. Tacconi, R. J. Wurtman // *Adv. Neural.* – 1986. – 43. – P. 675 – 685.

139. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance / D. Kim [et al.] // *Circulation.* – 2001. – № 104 (19). – P. 2338 – 2343.

140. Wahlung, K.-G. Separation of acidic drugs in the µg/ml range in untreated bloodplasma by direct injection on liquid chromatographic columns // *J. Chromatogr.* – 1981. – V. 218. – P. 671 – 679 p.

141. Ward, A. A. Effect of Cholinergic Drugs on Recovery of Function Following Lesions of the Central Nervous System in Monkeys / A. A. Ward, M. A. Kennard // *Yale Journal of Biology and Medicine.* – 1942. – № 15. – P. 189 – 228.

142. Weijenberg, A, Brouwer O. F, Callenbach P. M. Levetiracetam Monotherapy in Children with Epilepsy: A Systematic Review / A. Weijenberg, O. F. Brouwer, P. M. Callenbach // *CNS Drugs.* – 2015. – 29(5). – P. 371 – 382.

143. Winblad, B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses / B. Winblad // *CNS Drug Review.* – 2005. – 11(2). – P.169 – 182.

144. Winnicka, K. Piracetam – an old drug with novel properties? / K. Winnicka, M. Tomasiak, A. Bielawska // *Acta Poloniae Pharmaceutica.* – 2005. – 62(5). – P. 405 – 409.

145. Zheng, F. Levetiracetam for the treatment of status epilepticus / F. Zheng, C. Du, X. Wang // *Expert Review of Neurotherapeutics.* – 2015. – 15(10). – P. 1113 – 1121.

146. Zhu, J. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system / J. Zhu, E. Mix, B. Winblad // *CNS Drug Review.* – 2001. – 7(4). – P. 387 – 398.

147. Żwir-Ferenc, A. Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications (Review) / A. Żwir-Ferenc, M. Biziuk // *Polish J. of Environ. Stud.* – 2006. - Vol. 15, No. 5. – P. 677 – 690.

**ПРИЛОЖЕНИЕ**

### Характеристика лекарственных препаратов и биологически активных соединений из группы рацетамов

Название (МНН)	Химическое название	Фармакологический эффект	Форма выпуска; страны-производители (торговые названия препаратов)
1	2	3	4
<b>1 группа</b>			
Пирацетам Piracetam	2-Оксо-1- пирролидинацетамид	нейропротекторный [58, 143, 144]; мембраностабилизирующи й; антиоксидантный [9, 106]; мнемотропный; антигипоксический [58, 93]; анксиолитический; анальгетический; противовоспалительный; антиагрегантный.	Капсулы, таблетки 200, 400, 800 и 1200 мг; раствор для инъекций 20%; – Россия (Пирацетам, Ноотобрил, Эскотропил, Нооцетам); – Венгрия (Луцетам); – Польша (Мемотропил, Пиратропил); – Австрия (Церебрил, Пирабене); – Греция (Стамин, Пирацебрал); – Болгария (Пирамем); – Италия, Франция, Бельгия (Ноотропил); Республика Беларусь (Пирацезин – в комплексе с циннаризином); – Исландия, Болгария, Россия (Фезам – в комплексе с циннаризином); – Украина (Тиоцетам – в комбинации с тиотриазолином, Пирацетам); – Индия (Нормабрейн, Пирацетам)
Оксирацетам Oxiracetam	2-(4-гидрокси-2- оксопирролидин-1- ил)ацетамид	антигипоксический; когнитивный [112]; антиамнестический [93];	Капсулы 600 мг; - ISF, Италия. В настоящее время в клинической практике не используется.

1	2	3	4
		улучшение нейропсихической деятельности, вызванной скополамином [90, 93, 111]	
Анирацетам Aniracetam	1-(4-метоксибензоил)- 2-пирролидинон	анксиолитический [107]; мнемотропный [80, 102]; антиамнестический [93]	Капсулы 750 мг; – США (Ампамет) В настоящее время в клинической практике не используется.
Прамирацетам Pramiracetam	N-[2-(дипропан-2- иламино)этил]-2(2- оксопирролидин-1- ил)ацетамид	антиамнестический; мнемотропный [93]; адаптогенный; антиастенический [50]; анксиолитический; антидепрессивный [18, 37]	Таблетки 600 мг; – Италия (Прамистар)
Фенилпирацетам Phenylpiracetam	2-(4-фенил-2- оксопирролидин-1- ил)ацетамид	нейромодулирующий; анксиолитический; противосудорожный; антиастенический [58]; мнемотропный; нейропротекторный; антигипоксический [3, 120]; адаптогенный; кардиопротекторный	Таблетки 100 мг; – Россия (Фенотропил)

1	2	3	4
<b>2 группа</b>			
Леветирацетам Levetiracetam	(2S)-2-(2-оксопирролидин-1-ил)бутанамид	противосудорожный [30, 142, 145]; нейропротекторный	Таблетки 250, 500, 750 и 1000 мг; – Исландия (Леветинол), – Бельгия (Кеппра), – Турция (Комвирон, Эпикепран), – Израиль (Эпитерра), Индия (Леветирацетам), – Россия (Леветирацетам Канон).
Селетрацетам Seletracetam	(2S)-2-[(4R)-4-(2,2-дифторэтил)-2-оксопирролидин-1-ил]бутанамид	противосудорожный [74, 130]	С 2010 года исследования по разработке приостановлены [103]
Бриварацетам Brivaracetam	(2S)-2-[(4R)-2-оксо-4-пропилпирролидин-1-ил] бутанамид	противосудорожный [41, 74, 103]	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг и 100 мг, Раствор для инъекций 0,1%; – Бельгия (Бривиак)
<b>3 группа</b>			
Нефирацетам Nefiracetam	N - (2,6-диметилфенил)-2-(2-оксопирролидин-1-ил) ацетамид	когнитивный [93, 104, 108, 124]; противосудорожный [65, 91]; нейропротекторный [65]	Капсулы 500 мг; саше 500 мг. – США.
Ролипрам Rolipram	4-(3-циклопентилокси-4-метокси-фенил)пирролидин-2-он	антидепрессивный [101, 146] когнитивный [21, 122, 128]; иммуносупрессивный [121]; жаропонижающий [137];	10, 25, 50 и 100 мг; раствор для инъекций 10 мкМ; – США.

1	2	3	4
		противовоспалительный [123, 137, 146]; нейропротекторный	
Небрацетам Nebracetam	4-(аминометил)-1-бензил-пирролидин-2-он	нейропротекторный; когнитивный, антигипоксический [76, 98, 100]	Клинические исследования
Фазорацетам Fasoracetam (NS-105)	(5R)-5-(пиперидин-1-карбонил)пирролидин-2-он	когнитивный [115, 116]	Клинические исследования
Димирацетам Dimiracetam	дигидро-1H-пирроло[1,2-a]имидазол-2,5(3H,6H)дион	антиамнестический [136]; анальгетический	Клинические исследования
Колурацетам Coluracetam (МКС-231)	N-(2,3-диметил-5,6,7,8-тетрагидрофуоро[2,3-b]квинолин-4-ил)-2-(2-оксопирролидин-1-ил)ацетамид	когнитивный [41, 89, 105]; нейропротекторный	Доклинические исследования
Ролзирацетам Rolziracetam	2,6,7,8-тетрагидро-1H-пирролизин-3,5-дион	когнитивный [103]	Доклинические исследования

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
«Парма Клиникал»**

---

«Утверждаю»  
Директор по науке  
ООО «Парма Клиникал», г. Пермь  
Бомбела Т.В.  
2017 г.



**АКТ АПРОБАЦИИ**

**Наименование разработки:** методика количественного определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС).

**Место разработки:** ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии, лаборатория хроматографических методов РИЦ «Фарматест».

**Авторы:** аспирант Булгакова Е.А.; доцент Карпенко Ю.Н.

**Место апробации:** ООО «Парма Клиникал», г. Пермь, лаборатория физико-химических методов анализа.

**Результаты апробации:** Методика апробирована на модельных смесях плазмы крови с концентрациями КОН-1 на уровне 40; 120; 2400; 7200 нг/мл (в рамках предлагаемого аналитического диапазона). Исследование проведено с использованием системы для ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь Agilent 6460 (Agilent Technologies, США). Установлено, что методика обладает высокой чувствительностью и селективностью. Анализ модельных образцов на всех уровнях концентраций КОН-1 показал удовлетворительные результаты оценки правильности и прецизионности.

**Заключение:** предлагаемая авторами методика может быть использована при фармакокинетических исследованиях биологически активного соединения КОН-1.

Начальник лаборатории физико-химических  
методов анализа ООО «ПармаКлиникал»  
«19» 12 2017 г.

Н.А. Прозорова



**Акт  
внедрения научных достижений в учебный процесс**

Материалы диссертационной работы Булгаковой Евгении Александровны, аспиранта кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, посвященной разработке методик количественного определения биологически активного соединения КОН-1 в биологических объектах для целей изучения его фармакокинетики, внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии Пермской государственной фармацевтической академии.

Методики количественного определения КОН-1 в биологических жидкостях и внутренних органах лабораторных животных включены в практическое занятие «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 Пермской государственной фармацевтической академии.

Зав. кафедрой токсикологической химии,  
доктор фармацевтических наук, профессор

Т.Л. Малкова

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый проректор – проректор по учебно-воспитательной и социальной работе  
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,  
д.м.н., профессор

  
Ю.В. Шукин  
«29» 05 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Булгаковой Евгении Александровны «Разработка биоаналитических методик для исследования фармакокинетики биологически активного соединения – производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия» на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Результатом диссертационного исследования Булгаковой Е.А. являются разработанные методики изолирования, идентификации и количественного определения нового биологически активного соединения 4-(ацетил)-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-она (КОН-1), обладающего ноотропной активностью, в биологических жидкостях и тканях с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ- и масс-селективным детектированием. Данные методики были использованы для изучения фармакокинетики вещества КОН-1 на этапе доклинических исследований.

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета в составе: зав. кафедрой, к.фарм.н., доцента Воронина А.В., доцента, к.х.н. Шариповой С.Х., доцента, к.б.н. Расцветовой Н.В. подтверждает использование материалов диссертационной работы Булгаковой Е.А. в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий со студентами, обучающимися по специальности «Фармация».

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, к.фарм.н., доцент



А.В. Воронин

Доцент, к.х.н.



С.Х. Шарипова

Доцент, к.б.н.



Н.В. Расцветова