



И.И. Яичков^{1,2}
А.Л. Хохлов²
М.К. Корсаков¹
А.А. Шетнев¹
Н.Н. Вольхин¹
С.С. Петухов^{1,2}

Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», ул. Республиканская, д. 108/1, г. Ярославль, 150000, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Революционная, д. 5, г. Ярославль, 150000, Российская Федерация

✉ Яичков Илья Игоревич; i.yaichkov@yspu.org

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для изучения системной экспозиции селективного ингибитора карбоангидразы II типа производного изоксазола 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) необходима оценка его фармакокинетических параметров в цельной крови, поскольку это соединение способно накапливаться в эритроцитах. Ранее биоаналитические методики для решения данной задачи разработаны не были.

ЦЕЛЬ. Разработка биоаналитической методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в крови лабораторных животных и сравнение фармакокинетики глазной суспензии TFISA после однократной инстилляцией и внутрибрюшинного введения крысам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Количественное определение проводили методом высокоэффективной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием образцов крови крыс и кроликов. Хроматографическое разделение осуществляли с помощью колонки Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150×3,0 мм, 3,5 мкм) с применением 0,1% водного раствора муравьиной кислоты и метанола для градиентного элюирования. Масс-спектрометрическое детектирование выполняли в режиме мониторинга множественных реакций. Изучение фармакокинетики проводили на двух группах крыс линии Wistar по 6 особей (по 3 самца и 3 самки). Первой группе животных осуществляли инстилляцию 1% глазной суспензии TFISA в каждый глаз из расчета 3,7 мг/кг. Животным второй группы вводили этот же препарат внутрибрюшинно в той же дозе. Образцы крови отбирали до введения препарата, а также спустя определенные временные интервалы после введения.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Разработана ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения TFISA и его метаболитов в крови лабораторных животных (кроликов и крыс). ВЭЖХ-МС/МС-методика полностью валидирована в соответствии с нормативными актами Евразийского экономического союза и требованиями руководства ICH M10. Аналитический диапазон определения TFISA в крови составил 20–20000, N-гидроксипроизводного – 2–2000, N-ацетилпроизводного – 0,1–100,0 нг/мл. Максимальная концентрация TFISA в крови после инстилляцией в глаз достигала 8173±1491, N-гидроксипроизводного – 695±271, N-ацетилпроизводного – 6,33±1,51 нг/мл. Период полувыведения TFISA при данном пути введения составил 58±10, N-гидроксипроизводного – 70±24, N-ацетилпроизводного – 14±3 ч. Биодоступность действующего вещества составила 90,18%.

ВЫВОДЫ. Разработанная биоаналитическая методика определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (TFISA) и его метаболитов в крови лабораторных животных была успешно использована для анализа образцов цельной крови крыс. В ходе исследования фармакокинетики глазной суспензии данного соединения выявлен длительный период полувыведения действующего вещества и его метаболитов, а также высокая относительная биодоступность.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; tandemная масс-спектрометрия; кровь; валидация; фармакокинетика; ингибитор карбоангидразы II, N-гидроксисульфонамид; доклинические исследования; методика определения; период выведения; биодоступность

Для цитирования: Яичков И.И., Хохлов А.Л., Корсаков М.К., Шетнев А.А., Вольхин Н.Н., Петухов С.С. Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):304–316. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316>

Финансирование. Грант Российского научного фонда № 22-13-20085.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ilya I. Yaichkov^{1,2} 
Alexander L. Khokhlov² 
Mikhail K. Korsakov¹ 
Anton A. Shetnev¹ 
Nikita N. Volkhin¹ 
Sergey S. Petukhov^{1,2} 

Pharmacokinetics Study of a New Isoxazole Derivative in Rats Using HPLC-MS/MS for Blood Sample Analysis

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky,
108/1 Respublikanskaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

² Yaroslavl State Medical University,
5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

✉ Ilya I. Yaichkov; i.yaichkov@yspu.org

ABSTRACT

INTRODUCTION. Systemic exposure studies of a selective carbonic anhydrase II inhibitor, the isoxazole derivative 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (TFISA), require evaluating its pharmacokinetics in whole blood because the compound can accumulate in erythrocytes. Currently, no bioanalytical procedures have been developed to achieve this.

AIM. This study aimed to develop a bioanalytical procedure for the determination of TFISA and its metabolites (N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide) in the blood of laboratory animals and compare the pharmacokinetics of TFISA ophthalmic suspension in rats after a single ocular or intraperitoneal administration.

MATERIALS AND METHODS. The quantitative determination was performed by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using rat and rabbit blood samples. The chromatographic separation used a Zorbax Eclipse Plus C18 column (150×3.0 mm, 3.5 μm) and a gradient elution system of 0.1% aqueous formic acid and methanol. The multiple reaction monitoring mass spectrometry mode was used for detection. The pharmacokinetics study was conducted in 2 groups of 6 Wistar rats (3 males and 3 females per group). Group 1 received an instillation of 1% TFISA ophthalmic suspension in each eye at a dose of 3.7 mg/kg. Group 2 received an intraperitoneal injection of the same product at the same dose. Blood samples were collected at baseline and at several intervals after administration.

RESULTS. The authors developed a bioanalytical procedure for the determination of TFISA and its metabolites in the blood of laboratory animals (rabbits and rats). This HPLC-MS/MS procedure was fully validated in accordance with the requirements of the EAEU legislation and the ICH M10 guideline. The analytical ranges in blood were 20–20000 for TFISA, 2–2000 for the N-hydroxy metabolite, and 0.1–100.0 ng/mL for the N-acetyl metabolite. The maximum blood levels after ocular instillation (mean±SD) were 8173±1491 for TFISA, 694±271 for the N-hydroxy metabolite, and 6.33±1.51 ng/mL for the N-acetyl metabolite. The half-lives for this route of adminis-

tration were 58 ± 10 (TFISA), 70 ± 24 (N-hydroxy metabolite), and 14 ± 3 h (N-acetyl metabolite). The bioavailability of TFISA was 90.18%.

CONCLUSIONS. The developed and validated bioanalytical procedure for the determination of TFISA and its metabolites in the blood of laboratory animals has been successfully applied to samples of rat whole blood. According to the study of ophthalmic suspension pharmacokinetics, TFISA and its metabolites have long half-lives and high bioavailability.

Keywords: HPLC-MS/MS; tandem mass spectrometry; blood; validation; pharmacokinetics; carbonic anhydrase II inhibitor; N-hydroxysulfonamide; preclinical studies; assay; excretion period; bioavailability

For citation: Yaichkov I.I., Khokhlov A.L., Korsakov M.K., Shetnev A.A., Volkhin N.N., Petukhov S.S. Pharmacokinetics study of a new isoxazole derivative in rats using HPLC-MS/MS for blood sample analysis. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):304–316. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316>

Funding. Russian Science Foundation grant No. 22-13-20085.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

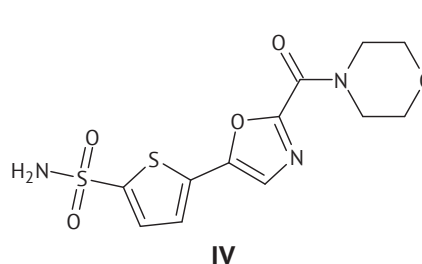
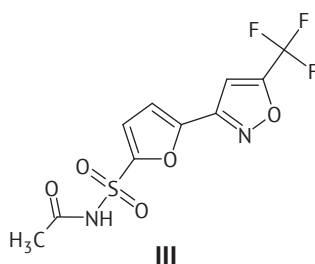
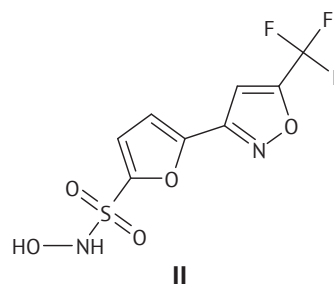
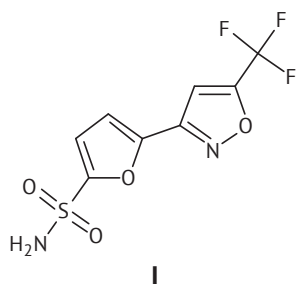
ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы карбоангидразы (КА) — лекарственные средства (ЛС), механизм действия которых основан на связывании с ионом цинка, находящимся в активном центре этого фермента. Такие ЛС широко применяют в офтальмологии для терапии открытоугольной глаукомы, характерным симптомом которой является повышенное внутриглазное давление. Терапевтический эффект при этом вызван уменьшением секреции внутриглазной жидкости в переднюю камеру глаза благодаря снижению активности КА II типа [1].

Первые препараты системного действия (ацетазоламид, метазоламид и этотозоламид) блокировали все изоформы КА, тем самым вызывая множественные нежелательные лекарственные реакции [1]. В настоящее время широко используют селективные ингибиторы КА II типа бринзоламид и дорзоламид, обладающие местным действием, которые производят, в том числе в форме глазной суспензии. Это значительно

снижает частоту и тяжесть побочных эффектов [2]. Новое соединение данной группы 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) (I) в виде 1% суспензии по своей фармакологической активности и продолжительности действия превосходит разработанные ранее ЛС [3]. В процессе биотрансформации данного соединения образуются два метаболита: N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M1) (II) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M2) (III).

Бринзоламид [4], дорзоламид [5], а также близкий по структуре к изучаемому действующему веществу 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид [6] при инстилляции в глаз способны попадать в системный кровоток. Поэтому в рамках данного исследования предусмотрено определение относительной биодоступности субстанции TFISA. Все представители группы ингибиторов КА способны накапливаться в эритроцитах [4–6], поэтому



при доклиническом изучении суспензии TFISA целесообразно определение фармакокинетических констант действующего вещества и его метаболитов в крови лабораторных животных в дополнение к рекомендованному в нормативной документации исследованию плазмы крови¹. Аналогичный подход к проведению фармакокинетических исследований характерен для циклоспорина А [7], такролимуса [8], эверолимуса [9], индапамида [10], финголимода [11]. В качестве биологического объекта для определения концентрации данных анализов также выбрана цельная кровь.

Биоаналитические методики для измерения концентрации TFISA и его метаболитов ранее разработаны не были. Дополнительной задачей при разработке методики является предотвращение разложения N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, способного окисляться с образованием 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновой кислоты [6, 12]. Так, в исследовании фармакокинетики 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида, который также метаболизируется путем N-гидроксилирования сульфонамидной группы, для данных целей был использован 10% водный раствор тиосульфата натрия, который добавляли к K₃ЭДТА-крови в объемном соотношении 1:1 [6].

Цель работы – разработка биоаналитической методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в крови лабораторных животных и сравнение фармакокинетики глазной суспензии TFISA после однократной инстилляции и внутрибрюшинного введения крысам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Активная субстанция 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его глазная суспензия разработаны и произведены в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. Состав исследуемой суспензии: TFISA – 50 мг, карбопол 974 – 20 мг, твин-80 – 2,5 мг, маннитол – 165 мг, 10% раствор натрия гидроксида до pH 7,5–8,5, 0,9% раствор натрия хлорида – до 5 мл. Данная субстанция находится на стадии доклинического исследования. Изучение фармакокинетики действующего вещества проводили на лабораторной серии суспензии.

В работе использовали метанол (LiChrosolv hypergrade for LC–MS, Merck KGaA) и муравьиную

кислоту (Optima LC–MS-Grade, Thermo Fisher Scientific), пригодные для ВЭЖХ-МС-анализа для приготовления подвижной фазы. Деионизированную воду получали с помощью установки Arium Mini (Sartorius AG).

В работе использованы субстанции, синтезированные в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского: 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (99,1%), N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (98,2%) (M1), N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (98,5%) (M2), 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид (THSA) (IV) (98,3%) – внутренний стандарт (BC). Структура и чистота данных соединений охарактеризованы методами ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии. Это позволило использовать их в качестве стандартных образцов определяемых веществ.

Исходные растворы анализов и внутреннего стандарта с концентрацией 1000 мкг/мл готовили в диметилсульфоксиде (х.ч., АО «Ленреактив»), рабочие растворы – в метаноле (режим хранения – не выше +4 °C).

Исследование проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС-системы, включающей в себя tandemный масс-спектрометрический детектор QTRAP 5500 (AB Sciex) и хроматограф 1260 Infinity (Agilent Technologies) с бинарным насосом G1312B, автодозатором G1329B с внешним термостатом G1330B, термостатом колонок G1316A. Для управления прибором использовано программное обеспечение Analyst 1.6.2, для интегрирования полученных хроматограмм – MultiQuant 3.0.5 (AB Sciex).

Хроматографическое разделение осуществляли в градиентном режиме на колонке Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150×3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (12,5×2,1 мм, 5,0 мкм) (Agilent Technologies) при скорости потока 0,6 мл/мин и температуре термостата 40 °C. Динамика изменения соотношения компонентов подвижной фазы: 0,1% водного раствора муравьиной кислоты (A) и метанола (B), представлена в *таблице 1*.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) (*табл. 2*). Количественные MRM-переходы использовали для количественного определения анализов, контрольные

¹ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

MRM-переходы — для дополнительного подтверждения правильности идентификации. MRM-переход внутреннего стандарта THSA 342→78 *m/z* с более интенсивным сигналом применяли для расчета концентрации TFISA, MRM-переход 342→110 *m/z* с менее интенсивным сигналом — для расчета концентрации M1 и M2. Для ионизации элюата использовалось электрораспыление: полярность отрицательная, напряжение — 4500 В; температура источника ионов — 700 °С.

Для подготовки проб крови применяли осаждение белков и форменных элементов: к 20 мкл крови лабораторного животного добавляли 200 мкл метанольного раствора THSA с концентрацией 500 нг/мл, смесь перемешивали, добавляли 10 мкл 1% водного раствора муравьиной кислоты и снова перемешивали. Пробу центрифугировали (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific) 5 мин при 10000 об./мин. Надосадочная жидкость вводилась в хроматографическую систему.

Калибровочные образцы (К1–К8), образцы контроля качества (нижний предел количественного определения (НПКО), нижний, средний и верхний

уровни концентрации) и образцы для теста разведения (Dil) готовили путем добавления к 95 мкл крови лабораторного животного 5 мкл комбинированного рабочего раствора аналитов соответствующего уровня концентрации. Концентрация аналитов в комбинированном рабочем растворе аналитов в 20 раз превышала их концентрацию в соответствующем образце (табл. 3).

Валидацию разработанной методики проводили согласно требованиям Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов² и руководства ICH M10³ по следующим показателям:

- селективность;
- градуировочная кривая;
- правильность и прецизионность внутри серии (по 2 серии на образцах биоматериала крысы и кролика) и между сериями;
- эффект разведения образца (двукратное разведение);
- эффект матрицы (расчет относительного стандартного отклонения (*RSD*), нормализованного фактора матрицы и правильности и прецизионности измерений на нижнем (*LQC*) и верхнем (*HQC*) уровнях концентрации);

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Table 1. Gradient elution conditions

Время, мин <i>Time, min</i>	0,1% водный раствор муравьиной кислоты (А), % <i>0.1% aqueous formic acid (A), %</i>	Метанол (В), % <i>Methanol (B), %</i>
0,0–0,5	65	35
2,0–5,0	65→35	35→65
5,0–5,1	35→10	65→90
5,1–7,0	10	90
7,0–7,1	10→65	90→35
7,1–8,0	65	35

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга множественных реакций

Table 2. Parameters of mass spectrometric detection in the multiple reaction monitoring mode

MRM-переходы, <i>m/z</i> <i>MRM-transitions, m/z</i>							
TFISA		M1		M2		THSA	
количес- твенный <i>quantitative</i>	контроль- ный <i>control</i>	количес- твенный <i>quantitative</i>	контроль- ный <i>control</i>	количес- твенный <i>quantitative</i>	контроль- ный <i>control</i>	BC для TFISA <i>IS for TFISA</i>	BC для M1, M2 <i>IS for M1 and M2</i>
281→136	281→66	297→136	297→66	323→136	323→66	342→78	342→110

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. MRM — мониторинг множественных реакций, TFISA — 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 — N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 — N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; THSA — 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид; BC — внутренний стандарт.
Note. MRM, multiple reaction monitoring; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; THSA, 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide; IS, internal standard.

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

³ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. EMA; 2022.

- перенос аналитов и ВС из предыдущей пробы;
- стабильность (краткосрочная стабильность (STS) (цельная кровь); долгосрочная стабильность (LTS) (цельная кровь); стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) (цельная кровь); стабильность приготовленных проб в автодозаторе (ASS);
- воспроизводимость при повторном введении аналитической серии.

Образцы НПКО, нижнего, среднего и верхнего уровня концентраций, а также Dil готовили в 6 повторностях для каждого испытания, калибровочные образцы — в одной повторности.

Для первоначальной оценки фармакокинетических параметров в крови в рамках данного исследования выбраны крысы, так как этот вид является наиболее доступной экспериментальной моделью [13, 14]. При выявлении высоких концентраций TFISA и его метаболитов в крови эксперимент может быть проведен также на втором виде животных-негрызунов — кроликах, поэтому методику разрабатывали для измерения концентрации аналитов в крови обоих видов животных.

Холостые образцы крови крыс линии Wistar массой более 500 г отбирали из яремной вены, холостые образцы крови кроликов породы Советская шиншилла массой более

3 кг — из ушной вены (все животные — питомник ООО «СМК Стезар»). Для данных целей использовали пробирки Improvacuter объемом 3 мл (Guangzhou Improve Medical Instruments Co.).

Оценку селективности и матричных эффектов проводили отдельно для каждого вида животных. Образцы контроля качества и холостые образцы готовили с применением крови, полученной от 6 разных животных, включая цельную и размороженную кровь. На основании результатов проведенных испытаний дизайн валидации был оптимизирован и количество серий по определению правильности и прецизионности сокращено до 2 для каждого биологического вида (крысы и кролики). Стабильность аналитов изучали только на образцах крови крыс, так как в ходе предварительного подбора антикоагулянта различий между матрицами не установлено.

Исследование фармакокинетики 1% суспензии 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида проводили на двух группах крыс линии Wistar по 6 особей (по 3 самца и 3 самки, питомник ООО «СМК Стезар»). Первой группе животных (масса 216±26 г ($M \pm SD$)) проводили инстилляцию лекарственного препарата из расчета 40 мкл в каждый глаз, что соответствовало дозе 3,7 мг/кг (в расчете на среднюю массу животных в группе):

Таблица 3. Концентрации 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в модельных образцах крови крысы

Table 3. Concentrations of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in spiked samples of rat blood

Аналит Analyte	Содержание в калибровочных образцах, нг/мл Analyte concentration in calibration samples, ng/mL							
	K1 (НПКО) (LLOQ)	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
TFISA	20	100	500	2000	5000	10000	15000	20000
M1	2	10	50	200	500	1000	1500	2000
M2	0,1	0,5	2,5	10,0	25,0	50,0	75,0	100,0
Аналит Analyte	Содержание в образцах контроля качества, нг/мл Analyte concentration in quality control samples, ng/mL							
	Нижний уровень концентрации LQC		Средний уровень концентрации MQC		Верхний уровень концентрации HQC		Dil	
TFISA	60		7500		17500		35000	
M1	6		750		1750		3500	
M2	0,3		37,5		87,5		175	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. TFISA — 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 — N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 — N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; НПКО — нижний предел количественного определения; Dil — образцы для теста разведения.

Note. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low concentration quality control sample; MQC, middle concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; Dil, samples for the dilution integrity test.

Второй группе (масса 230 ± 32 г ($M \pm SD$)) вводили изучаемую суспензию внутривенно в дозе 3,7 мг/кг. Данный способ выбран для оценки относительной биодоступности ввиду нерастворимости действующего вещества в воде. Использование двух параллельных групп животных обосновано длительным периодом полувыведения TFISA и его основного метаболита М1. Рандомизацию испытуемых не проводили. Отбор проб крови выполняли до введения препарата, а также через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72; 144; 216 ч после введения в объеме 0,2 мл. Для данных целей использовали капиллярные пробирки Impromini (Guangzhou Improve Medical Instruments Co.), содержащие смесь натрия фторид и калия оксалата. Затем аликвоту цельной крови объемом 50 мкл замораживали до температуры не выше -70 °C (морозильная камера MELING DV-HL218).

Исследование одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

Фармакокинетические параметры изучаемых соединений рассчитывали с применением программного пакета R v. 3.3.2 (модуль Bear v. 2.7.7) (R-Project): оценены максимальная концентрация аналита в крови (C_{max}), время наступления максимальной концентрации аналита в крови (T_{max}), площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до времени последнего отбора крови (AUC_{0-t}), площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), константа элиминации (K_{el}), период полувыведения аналита ($T_{1/2}$), среднее время удержания аналита в крови (MRT); использован некомпартментный подход.

Программное обеспечение Statsoft Statistica 10.0.1011 использовано для расчета показателей описательной статистики: среднего арифметического (M), стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD), стандартной ошибки среднего (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подобранные условия хроматомасс-спектрометрического определения позволили достичь высокого уровня чувствительности для определения каждого аналита. Выбранная программа градиентного элюирования (табл. 1) позволила надежно разделить TFISA и его ацетилированный метаболит М2 (разрешение между пиками >5), который подвержен фрагментации

в процессе ионизации до исходного иона действующего вещества. Это обеспечило требуемую селективность разработанной методики.

На следующей стадии исследования осуществляли выбор антикоагулянта путем оценки краткосрочной стабильности (24 ч на холоде элементе со льдом), стабильности приготовленных проб в автосэплере (24 ч при $+4$ °C), стабильности после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) основного метаболита N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида. При этом использовали свежую цельную кровь и размороженную кровь, хранившуюся в течение 1 месяца в морозильной камере при температуре не выше -70 °C. Необходимость такого эксперимента обусловлена возможным снижением активности антиоксидантных систем эритроцитов в процессе хранения. В качестве антикоагулянтов применяли K_3 ЭДТА, гепарин лития и натрия фторид / калия оксалат ($NaF/K_2C_2O_4$). На начальном этапе анализировали по 2 пробы цельной и гемолизированной крови с добавлением каждого антикоагулянта и комбинированного рабочего раствора аналитов с концентрацией на уровне НQC: 1 проба — из крови крысы, 1 проба — из крови кролика. Для осаждения белков и форменных элементов применяли только метанольный раствор THSA. Расчеты осуществляли методом внешнего стандарта относительно свежеприготовленного образца.

Результаты определения STS и FTS с использованием гепарина лития и смеси $NaF/K_2C_2O_4$ соответствовали допустимому диапазону 85–115%⁴ от номинального значения концентрации М1. При хранении проб в автосэплере наблюдали разложение N-гидроксиметаболита при применении всех антикоагулянтов, но при применении комбинации $NaF/K_2C_2O_4$ оно было наименьшим. Данный антикоагулянт был выбран для дальнейшего подтверждающего исследования, в ходе которого анализировали по 6 проб цельной и гемолизированной крови с добавкой аналитов: 3 пробы — из крови крысы, 3 пробы — из крови кролика. Для стабилизации М1 к пробам после осаждения компонентов матрицы метанолом добавляли 1% водный раствор муравьиной кислоты, как и в работе [6] для стабилизации близкого по структуре N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида. Полученные результаты соответствовали установленным требованиям⁵ (рис. 1 «Результаты изучения стабильности N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-

⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.

⁵ Там же.

оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в крови с применением различных антикоагулянтов», опубликован на сайте журнала⁶).

После выбора антикоагулянта и условий пробоподготовки проведена полная валидация разработанной методики (табл. 4, 5). Оценка селективности определения изучаемых соединений и внутреннего стандарта выполнена совместно с испытанием внутрисерийной прецизионности и правильности (табл. 6 «Результаты оценки внутрисерийной правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови лабораторных животных», опубликована на сайте журнала⁷). Площадь хроматографических пиков TFISA, M1 и M2 на хроматограммах холостых образцов крови крыс и кроликов не превышала 20%, площадь хроматографического пика THSA — 5% от площади хроматографических пиков данных веществ в соответствующих образцах с концентрацией НПКО (рис. 2 «Примеры хроматограмм холостого образца крови крысы и образца на уровне нижнего предела количественного применения», опубликован на сайте журнала⁸). Калибровочные зависимости, которые строили по соотношениям площадей хроматографических пиков «аналит/THSA», носили линейный характер. Угловые и свободные коэффициенты градуировочных кривых были близки для образцов крови обоих видов животных.

Изучение матричных эффектов проводили двумя способами. По первому способу осуществляли расчет коэффициента вариации нормализованного фактора матрицы (NMF)². Его величина составляла 1,91–8,75% для каждого изучаемого соединения в крови крыс и кроликов и не превышала максимально допустимые 15%. Значение NMF аналитов в крови у обоих видов животных при этом близкие: 0,872–0,908 — для TFISA, 0,836–0,884 — для M1, 0,887–0,922 — для M2. Максимальная разница между NMF составляла 5,43% (для M1), что значительно меньше 15%. Это позволяет объединить результаты аналитических серий, выполненных на образцах крови крысы и кролика, при оценке межсерийной прецизионности и правильности. Оценка матричных эффектов вторым способом проводили путем расчета относительной погрешности (δ) и RSD на нижнем и верхнем уровнях концентраций (табл. 6, опубликована

на сайте журнала⁹). Величина δ в случае каждого аналита укладывалась в диапазон $-9,83 \div 10,36\%$, RSD не превышало 9,30%, что соответствовало установленным требованиям¹⁰.

Правильность и прецизионность методики изучали путем анализа 4 аналитических серий: по 2 серии на образцах крови крыс и кроликов (табл. 5, 6). Средние значения δ каждого аналита входили в установленный диапазон $\pm 15\%$ в образцах нижнего, среднего и верхнего уровней концентрации, значения RSD для каждого уровня не превышала 15%. Для НПКО-проб величина δ для TFISA, M1 и M2 составляла $\pm 20\%$, величина RSD была менее 20% (табл. 6, опубликована на сайте журнала¹¹). Результаты межсерийного сравнения также входили в указанные выше допустимые диапазоны (табл. 5). При двукратном разведении проб крови с концентрацией Dil относительная погрешность определения для TFISA составила 7,95%, для M1 — 6,48%, для M2 — 6,87%, что соответствовало критериям приемлемости. Перенос TFISA из предыдущей пробы в холостой образец не превышал 20% от уровня образца НПКО, перенос остальных аналитов и внутреннего стандарта из предыдущей пробы отсутствовал.

В ходе валидации подтверждена краткосрочная стабильность, стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки, долгосрочная стабильность при температуре не выше минус 70 °C в течение 30 сут, стабильность приготовленных проб в автодозаторе (табл. 7): отклонение рассчитанных концентраций аналитов от номинальных значений не превышало $\pm 15\%$. Для испытаний использовали только образцы крови крыс ввиду отсутствия различий в матричных эффектах и приемлемых результатов предварительных испытаний, выполненных на биологических объектах обоих видов. При повторном анализе серии спустя 72 ч величина относительной погрешности измерений аналитов входила в диапазон $-0,49 \div 9,09\%$, а величина RSD на каждом уровне концентраций $-2,09 \div 12,95\%$ (табл. 5). Таким образом, выбранный антикоагулянт предотвратил разложение M1 при хранении образцов крови, а добавление 1% раствора муравьиной кислоты обеспечило стабильность приготовленных проб в автодозаторе.

Исследование фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида

⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig1>

⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6>

⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig2>

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6>

¹⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.

¹¹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6>

Таблица 4. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови лабораторных животных (основные параметры валидации)
Table 4. Accuracy and precision evaluation results for the method for the determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in the blood of laboratory animals (main validation parameters)

Испытание Test		TFISA	M1	M2
Калибровочная зависимость Calibration function		Линейная Linear	Линейная Linear	Линейная Linear
Весовой коэффициент Weighting factor		1/x ²	1/x	1/x
Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/mL		20–20000	2–2000	0,1–100
Угловые коэффициенты калибровочных кривых (мин.–макс.) Slopes of calibration curves (min.–max.)	Крыса Rat	0,00062–0,00070	0,0085–0,0010	0,0395–0,0464
	Кролик Rabbit	0,00063–0,00069	0,0086–0,0010	0,0410–0,0452
Свободные коэффициенты калибровочных кривых (мин.–макс.) Intercepts of calibration curves (min.–max.)	Крыса Rat	0,0016–0,0019	0,0012–0,0018	0,099–0,0151
	Кролик Rabbit	0,0015–0,0018	0,0010–0,0015	0,0102–0,0140

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data
Примечание. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; x – концентрация.
Note. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; x, concentration.

в форме 1% глазной суспензии проводили с использованием валидированной методики. Рассчитанные значения фармакокинетических параметров TFISA, M1 и M2 после инстилляцией лекарственного препарата в глаз и его внутрибрюшинного введения представлены в таблице 8, их фармакокинетические профили – на рисунке 3.

Величина максимальной концентрации TFISA в крови составила ~8 мкг/мл после глазной инстилляцией (OI) и ~11,6 мкг/мл после внутрибрюшинной инъекции (IP). Значения AUC_{0-t} данного соединения при обоих способах введения достаточно близкие, величина относительной биодоступности действующего вещества – 90,2% (табл. 8). Период полувыведения TFISA достаточно длительный – около 58 ч (OI) и 61 ч (IP) и сопоставимый при двух изученных путях введения.

Фармакокинетический профиль основного метаболита M1 после закапывания суспензии в глаз характеризовался медленным нарастанием концентрации данного анализа до величины ~0,7 мкг/мл к ~7,7 ч после введения и медленным ее снижением (рис. 3). При внутрибрюшинном способе введения детектирован более высокий уровень C_{max} данного метаболита – ~1,6 мкг/мл, достигнутый значительно быстрее – через 1,8 ч после введения. Длительность периода полувыведения M1 после инстилляцией составила ~70 ч, а после инъекции в брюшную полость – ~93 ч. N-гидроксипроизводное имело близкие значения

AUC_{0-t} при обоих способах введения (табл. 8). Это может быть связано с более медленным перераспределением действующего вещества из эритроцитов в плазму после закапывания в глаз, что привело к более продолжительному образованию и элиминации M1. При инъекции, вероятно, TFISA сразу в большом количестве проникает в плазму, из которой легче попадает в гепатоциты, поэтому в первые часы после внутрибрюшинного введения TFISA подвергается более интенсивной биотрансформации.

Концентрации N-ацетилпроизводного в крови значительно ниже концентраций TFISA, N-гидроксипроизводного. Так, при инстилляцией ЛС в глаз C_{max} достигает ~6,4 нг/мл, а при внутрибрюшинной инъекции – ~19,0 нг/мл. Величина T_{max} M2 (2,4 ч (OI) и 1,7 ч (IP)) при обоих способах введения близка к T_{max} TFISA (2,8 ч (OI) и 1,3 ч (IP)). Период полувыведения M2 меньше, чем TFISA и M1. При этом его величина после закапывания изучаемого препарата в глаз меньше, чем после инъекции в брюшную полость: ~14,5 ч (OI) и ~17,6 ч (IP). При внутрибрюшинном введении также получено более высокое значение AUC_{0-t} , которое приблизительно в 2 раза превосходит AUC_{0-t} (OI) (табл. 7). Удлинения фазы снижения концентрации на фармакокинетическом профиле M2 за счет его накопления после инстилляцией суспензии TFISA также не наблюдали (рис. 3). Это свидетельствует о более быстром выводе данного метаболита из системного кровотока.

Таблица 5. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови лабораторных животных (дополнительные параметры валидации)

Table 5. Accuracy and precision evaluation results for the method for the determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in the blood of laboratory animals (additional validation parameters)

Испытание <i>Test</i>	Концентрация <i>Concentration</i>	TFISA		M1		M2	
		δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %
Межсерийная правильность и прецизионность <i>Between-run accuracy and precision</i>	НПКО (LLOQ)	3,89	8,90	-5,87	9,78	1,66	12,84
	LQC	4,88	5,75	5,06	10,86	0,54	6,91
	MQC	2,89	4,37	-6,32	7,13	1,19	6,29
	HQC	0,64	7,42	-9,09	3,17	2,07	7,04
Воспроизводимость при повторном вводе серии (72 ч) <i>Reinjection reproducibility (72 h)</i>	НПКО (LLOQ)	1,08	6,42	3,00	6,54	7,77	8,02
	LQC	4,10	4,12	8,14	12,95	4,80	8,26
	MQC	9,09	4,40	3,51	2,09	0,03	3,32
	HQC	1,44	3,56	2,61	4,25	-0,49	3,26
Эффект разведения образца (двухкратное разведение) <i>Dilution integrity (two-fold dilution)</i>	Dil	7,95	3,06	6,48	3,37	6,87	4,14
Эффект матрицы <i>Matrix effect</i>	Концентрация <i>Concentration</i>	NMF	RSD (NMF), %	NMF	RSD (NMF), %	NMF	RSD (NMF), %
	Крыса <i>Rat</i>	LQC	0,875	1,93	0,836	1,83	0,907
		HQC	0,908	5,14	0,884	4,70	0,887
	Кролик <i>Rabbit</i>	LQC	0,872	1,91	0,874	4,60	0,922
		HQC	0,886	3,71	0,863	4,73	0,920

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. НПКО — нижний предел количественного определения; LQC, MQC, HQC — образцы контроля качества нижнего, среднего и верхнего уровней; Dil — концентрация для оценки эффекта разведения; TFISA — 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 — N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 — N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид, δ — относительная погрешность, NMF — коэффициент вариации нормализованного фактора матрицы, RSD — относительное стандартное отклонение.

Note. LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low concentration quality control sample; MQC, middle concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; Dil, concentration for the dilution integrity test; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; δ, relative error; NMF, coefficient of variation of the normalised matrix factor; RSD, relative standard deviation.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоаналитическая методика количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его N-гидрокси- и N-ацетилпроизводного в крови лабораторных животных была валидирована согласно актуальным регуляторным требованиям. В ходе испытаний были доказаны селективность, линейность калибровочной зависимости, правильность, прецизионность и отсутствие влияния разведения пробы на данные характеристики методики, отсутствие переноса аналитов и внутреннего стандарта из предыдущей пробы, эффекта матрицы, а также воспроизводимость при повторном введении аналитической серии. Использование смеси натрия фторида и калия оксалата в качестве антикоагулянта обеспечило стабильность N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и других аналитов в пробах в процессе их обработки и хранения в морозиль-

ной камере. Широкий аналитический диапазон методики позволил измерить как высокие концентрации аналитов на начальных временных точках (без дополнительного разведения), так и их следовые количества в поздних точках отбора.

В результате исследования фармакокинетики глазной суспензии изучаемого ЛС зафиксированы высокие концентрации действующего вещества и N-гидроксиметаболита в крови крыс, а также длительный период их выведения как при инстилляции в глаз, так и при внутрибрюшинной инъекции. Содержание метаболита (N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида) в крови значительно ниже, чем неизменного действующего вещества и его N-гидроксипроизводного, и его элиминация происходит значительно быстрее. Также установлено, что 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламид при использовании в данной лекарственной форме имеет высокую величину относительной биодоступности.

Таблица 7. Испытание стабильности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови крыс

Table 7. Stability testing of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat blood

Испытание Test	Температурный режим Temperature mode	Отклонение от номинального значения, % Deviation from the nominal value, %					
		TFISA		M1		M2	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Краткосрочная стабильность Short-term stability	Хладоэлемент со льдом (24 ч) Ice pack (24 h)	5,72	-8,78	-3,92	-9,57	0,22	-4,69
Стабильность после 3 циклов заморозки и разморозки Stability after 3 freeze-thaw cycles	Не выше -70 °C (12 ч) / Хладоэлемент со льдом (4 ч) No higher than -70 °C (12 h) / Ice pack (4 h)	6,76	-0,94	-0,89	-4,57	1,33	-1,84
Стабильность приготовленных проб в автосэмплере Autosampler stability	Не выше +4 °C (48 ч) No higher than +4 °C (48 h)	7,92	1,23	-3,33	-12,84	1,24	2,82
Долгосрочная стабильность Long-term stability	Не выше -70 °C (30 сут) No higher than -70 °C (30 days)	1,91	-4,57	-3,5	-7,76	2,33	-4,57

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. LQC — нижний уровень концентраций; HQC — верхний уровень концентраций; TFISA — 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 — N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 — N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид.

Note. LQC, low concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide.

Таблица 8. Фармакокинетические параметры 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в крови крысы

Table 8. Pharmacokinetic parameters of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat blood

	Параметр Parameter		C_{max} , нг/мл (ng/mL)	T_{max} , ч (h)	AUC_{0-1} , нг*ч/мл (ng*h/mL)	$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл (ng*h/mL)	$T_{1/2}$, ч (h)	K_{el} , ч ⁻¹ (h ⁻¹)	MRT, ч (h)
TFISA	Инстилляционная в глаз Ocular instillation	M	8173	2,8	394313	440507	58,2	0,0122	68,7
		SD	1491	2,6	85096	114764	10,3	0,0023	6,0
		RSD	18.3	92,5	21.6	26.1	17,7	18.87	8,7
		SEM	609	1,1	34740	46852	4,2	0,0009	2,4
	Внутрибрюшинное введение Intraperitoneal administration	M	11638	1,3	437248	463706	60,9	0,0130	61,1
		SD	3098	0,3	105972	103362	29,5	0,0042	5,1
		RSD	26.6	21,9	24.2	22.3	48,5	32,26	8,4
		SEM	1265	0,1	43263	42197	12,0	0,0017	2,1
M1	Инстилляционная в глаз Ocular instillation	M	695	7,7	18795	20477	70,5	0,0107	47,9
		SD	271	0,8	5575	6185	24,0	0,0031	4,2
		RSD	39.0	10,7	29.7	30.2	34,0	28,93	8,8
		SEM	111	0,3	2276	2525	9,8	0,0013	1,7
	Внутрибрюшинное введение Intraperitoneal administration	M	1624	1,8	18826	20734	93,0	0,0083	35,5
		SD	168	0,6	5139	6755	33,9	0,0031	7,3
		RSD	10.4	33,0	27.3	32.6	36,5	36,89	20,5
		SEM	69	0,3	2098	2758	13,8	0,0013	3,0
M2	Инстилляционная в глаз Ocular instillation	M	6,4	2,4	70,3	73,9	14,5	0,0499	15,4
		SD	1,5	0,9	23,9	24,0	3,3	0,0119	3,4
		RSD	23,74	38,0	34,0	32,5	22,5	23,77	21,9
		SEM	0,6	0,4	9,8	9,8	1,3	0,0048	1,4
M2	Внутрибрюшинное введение Intraperitoneal administration	M	19,0	1,7	141,5	142,7	17,6	0,0546	16,0
		SD	4,7	0,3	64,4	70,3	10,3	0,0336	9,7

Продолжение таблицы 8

Table 8 (continued)

	Параметр Parameter		C_{max} , нг/мл (ng/mL)	T_{max} , ч (h)	AUC_{0-t} , нг*ч/мл (ng*h/mL)	$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл (ng*h/mL)	$T_{1/2}$, ч (h)	K_{el} , ч ⁻¹ (h ⁻¹)	MRT, ч (h)
M2	Внутрибрюшинное введение Intraperitoneal administration	RSD	24,59	15,5	45,6	49,3	58,6	61,48	60,3
		SEM	1,9	0,1	26,3	28,7	4,2	0,0137	4,0

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; SEM – стандартная ошибка среднего.

C_{max} – максимальная концентрация аналита в крови, T_{max} – время наступления максимальной концентрации аналита в крови, AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до времени отбора последнего отбора крови, $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до бесконечности, K_{el} – константа элиминации, $T_{1/2}$ – период полувыведения аналита, MRT – среднее время удержания аналита в крови крысы.

Note. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M, mean; SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation; SEM, standard error of the mean.

C_{max} , maximum analyte concentration in blood, T_{max} , time to maximum analyte concentration in blood; AUC_{0-t} , area under the pharmacokinetic curve from the time of administration to the last blood sampling; $AUC_{0-\infty}$, area under the pharmacokinetic curve from the time of administration to infinity; K_{el} , elimination rate constant; $T_{1/2}$, half-life period of the analyte; MRT, mean residence time of the analyte in rat blood.

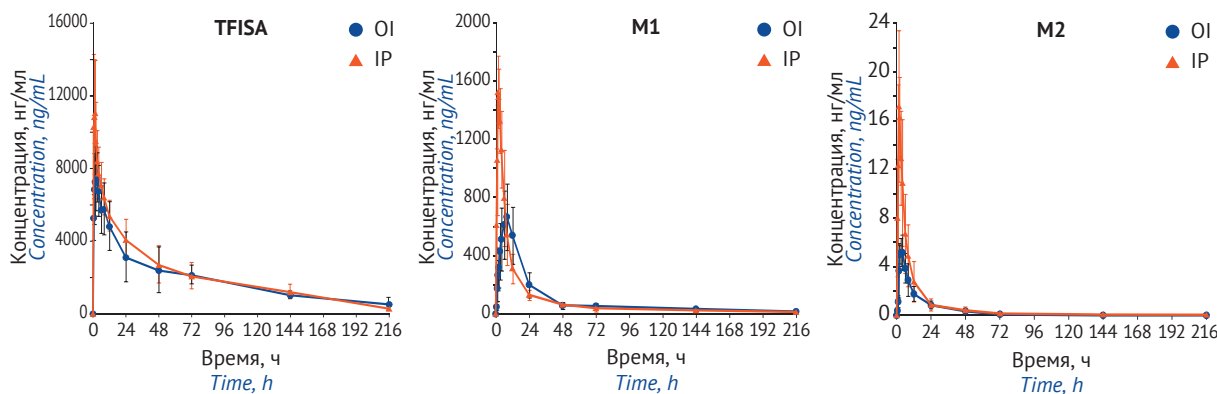


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Фармакокинетические кривые 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в крови крысы (M±SD). Красный интервал SD-IP, черный интервал SD-OI

TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; OI – инстилляция в глаз; IP – внутрибрюшинное введение; M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение.

Fig. 3. Pharmacokinetic curves for 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfanilamide and its metabolites in rat blood (M±SD). The red SD interval is for the intraperitoneal injection (IP), and the black SD interval is for the ocular instillation (OI)

TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M, mean; SD, standard deviation.

Показано, что валидированная методика применима для анализа целевых аналитов в крови как крыс, так и кроликов (установлено сходство ряда валидационных параметров (селективность, эффект матрицы, коэффициенты уравнений регрессии). В дальнейшем

с ее применением планируется осуществить изучение фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида на кроликах для проверки влияния межвидовых различий в строении глаза на биодоступность данного ЛС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Popovic MM, Schlenker MB, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Serious adverse events of oral and topical carbonic anhydrase inhibitors. *JAMA Ophthalmol.* 2022;140(3):235–42. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2021.5977>
- Курышева НИ. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 2. *Офтальмология.* 2020;17(4): 676–82. Kurysheva NI. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of glaucoma. Review. Part II. *Ophthalmology in Russia.* 2020;17(4):676–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-4-676-682>
- Хохлов АЛ, Шетнев АА, Корсаков МК, Федоров ВН, Тюшина АН, Вольхин НН, Вдовиченко ВП. Фармакологические свойства производных сульфонамидов – новых ингибиторов карбоангидразы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;175(2):166–70.

- Khokhlov AL, Shetnev AA, Korsakov MK, Fedorov VN, Tyushina AN, Volkhin NN, Vdovichenko VP. Pharmacological properties of sulfonamide derivatives – new inhibitors of carbonic anhydrase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;175(2):166–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-2-166-170>
4. Madrewar AB, Deshpande AS, Bhattacharya S. Mini-review on bioanalytical estimation of brinzolamide. *Curr Pharm Anal.* 2022;18(3):265–72. <https://doi.org/10.2174/1573412917666210812103414>
 5. Lo Faro AF, Tini A, Gottardi M, Pirani F, Sirignano A, Giorgetti R, et al. Development and validation of a fast ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determining carbonic anhydrase inhibitors and their metabolites in urine and hair. *Drug Test Anal.* 2021;13(8):1552–60. <https://doi.org/10.1002/dta.3055>
 6. Khokhlov AL, Yaichkov II, Korsakov MK, Shetnev AA, Volkhin NN, Petukhov SS. Development of quantification methods of a new selective carbonic anhydrase II inhibitor in plasma and blood and study of the pharmacokinetics of its ophthalmic suspension in rats. *Res Results Pharmacol.* 2023;9(4):53–64. <https://doi.org/10.18413/rrpharmacology.9.10056>
 7. Yuan Y-S, Liao J-M, Kang C-M, Li B-L, Lei X-R, Yu K-W, et al. A simple and accurate LC-MS/MS method for monitoring cyclosporin A that is suitable for high throughput analysis. *Exp Ther Med.* 2023;26(1):342. <https://doi.org/10.3892/etm.2023.12041>
 8. Yu K-W, Li B-L, Yuan Y-S, Liao J-M, Li W-K, Dong H, Ke P-F, et al. A modified LC-MS/MS method for the detection of whole blood tacrolimus and its clinical value in Chinese kidney transplant patients. *Heliyon.* 2022;8(8):e10214. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10214>
 9. Verheijen RB, Thijssen B, Atrafi F, Schellens JHM, Rosing H, de Vries N, et al. Validation and clinical application of an LC-MS/MS method for the quantification of everolimus using volumetric absorptive microsampling. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019;1104:234–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.11.030>
 10. Rajput AP, Edlabadkar AP. A coherent analytical review of indapamide. *J Pharm Tech Res Manag.* 2022;10(1):21–35. <https://doi.org/10.15415/jptm.2022.101004>
 11. Gopinath R, Narendran ST, Kumar M. A sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantitative bioanalysis of fingolimod in human blood: application to pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2022;34(6):e4822. <https://doi.org/10.1002/bmc.4822>
 12. Raghuvanshi DS, Verma N. An iodine-mediated new avenue to sulfonylation employing N-hydroxy aryl sulfonamide as a sulfonylating agent. *Org Biomol Chem.* 2021;19:4760–7. <https://doi.org/10.1039/d1ob00036e>
 13. Аладышева ЖИ, Беляев ВВ, Береговых ВВ, Бркич ГЭ, Грейбо СВ, Демина НБ и др. Промышленная фармация. Путь создания продукта. М.: Российская академия наук; 2019. Aladysheva Zhl, Belyaev VV, Beregovykh VV, Brkich GE, Greibo SV, Demina NB, et al. *Industrial pharmacy: the way to create a product.* Moscow: Russian Academy of Sciences; 2019 (In Russ.). EDN: KWJUK
 14. Гайдай ЕА, Гайдай ДС. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2019;(4). Gajdaj EA, Gajdaj DS. Genetic variety of laboratory mice and rats: history of occurrence, methods of obtaining and control. *Laboratory Animals for Science.* 2019;(4) (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-09>

Соответствие принципам этики. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены: таблица 6, рисунок 1, рисунок 2. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig1> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.И. Яичков — разработка и валидация биоаналитической методики, анализ образцов биоматериала животных, написание текста рукописи; А.Л. Хохлов — критическое обсуждение и окончательное утверждение текста рукописи; М.К. Корсаков, А.А. Шетнев — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов — выполнение работ с лабораторными животными.

Ethics approval. The study was approved by the Ethics Committee at the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky (Approval No. 2 of 10.10.2023).

Additional information. The following additional materials are posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*: Table 6, Figure 1, and Figure 2. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig1> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig2>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya I. Yaichkov developed and validated the bioanalytical procedure, analysed samples of animal biological material, and drafted the manuscript. Alexander L. Khokhlov participated in the critical discussion of the manuscript and approved the final version for publication. Mikhail K. Korsakov and Anton A. Shetnev participated in the critical discussion and editing of the manuscript. Nikita N. Volkhin and Sergey S. Petukhov handled laboratory animals.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Яичков Илья Игоревич, канд. фарм. наук / Ilya I. Yaichkov, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>

Хохлов Александр Леонидович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор / Alexander L. Khokhlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

Корсаков Михаил Константинович, д-р хим. наук, доцент / Mikhail K. Korsakov, Dr. Sci. (Chem.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>

Шетнев Антон Андреевич, канд. хим. наук / Anton A. Shetnev, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4389-461X>

Вольхин Никита Николаевич / Nikita N. Volkhin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>

Петухов Сергей Станиславович / Sergey S. Petukhov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>

Поступила 01.04.2024

После доработки 23.04.2024

Принята к публикации 18.06.2024

Received 1 April 2024

Revised 23 April 2024

Accepted 18 June 2024