



Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных

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

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского». Центр трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова. 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России). 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

✉ Контактное лицо: Яичков Илья Игоревич. E-mail: iyaichkov@yspu.org

ORCID: И. И. Яичков – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;

М. К. Корсаков – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;

А. А. Шетнев – <https://orcid.org/0000-0002-4389-461X>;

Н. Н. Вольхин – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;

С. С. Петухов – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>.

Статья поступила: 27.02.2024

Статья принята в печать: 27.08.2024

Статья опубликована: 28.08.2024

Резюме

Введение. Изучение системной экспозиции нового оригинального лекарственного препарата является обязательным этапом его доклинического исследования. 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид является новым селективным ингибитором карбоангидразы II для лечения открытоугольной глаукомы. Методики количественного определения данного соединения и его N-гидрокси- и N-ацетилметаболитов в плазме лабораторных животных ранее разработаны не были.

Цель. Разработка и валидация методики количественного 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 (M_1) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_2) в плазме крови крысы и кролика методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы. Для пробоподготовки применялось осаждение белков метанолом. В качестве внутреннего стандарта использован 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид. К пробам плазмы добавлялся 5%-й водный раствор аскорбиновой кислоты в объемном соотношении 1:2 для предотвращения разложения N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида. В качестве антикоагулянта выбрана комбинация натрия фторида и калия оксалата. Хроматографическое разделение проводили 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) с применением подвижной фазы на основе 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты и метанола. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме MRM с использованием электрораспылительной ионизации в отрицательной полярности. Апробацию методики проводили во время фармакокинетического исследования 1%-й глазной суспензии 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на 6 крысах линии Wistar. Образцы крови отбирали до введения, а также спустя 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 144 ч, 216 ч после введения. Некомпарментный подход использовался для расчета фармакокинетических параметров.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика прошла валидацию по показателям «селективность», «калибровочная кривая», «правильность и прецизионность», «эффект матрицы», «эффект разведения», «эффект переноса из предыдущей пробы», «воспроизводимость при повторном введении серии», «стабильность». Аналитический диапазон определения в плазме 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида составил 10–4000 нг/мл, M_1 – 1,0–400,0 нг/мл, M_2 – 0,1–40,0 нг/мл. Выбранная комбинация антикоагулянта и раствора стабилизатора позволяет хранить образцы плазмы в течение 28 дней в морозильной камере.

Заключение. Разработанная методика в ходе проведенной валидации подтвердила свою пригодность для количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме крови лабораторных животных. Данная методика успешно использована при исследовании фармакокинетики 1%-й глазной суспензии изучаемого препарата.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, плазма, стабилизация, валидация, фармакокинетика, ингибитор карбоангидразы II, N-гидроксисульфонамид

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. И. Яичков проводил разработку и валидацию биоаналитической методики, анализ образцов животных. М. К. Корсаков, А. А. Шетнев отвечали за формулирование целей и задач, организационную часть исследования. Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов отвечали за работу с лабораторными животными.

Финансирование. Статья подготовлена в рамках Государственного задания Ярославского государственного педагогического университета им. К. Д. Ушинского на 2024 год от Минпросвещения России по теме «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы» (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

Для цитирования: Яичков И. И., Корсаков М. К., Шетнев А. А., Вольхин Н. Н., Петухов С. С. Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):219–230. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1771>

Development and validation of the method of quantification of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in laboratory animal plasma

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

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky. M. V. Dorogov Pharmaceutical Technology Transfer Center. 108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

✉ **Corresponding author:** Ilya I. Yaichkov. **E-mail:** i.yaichkov@yspu.org

ORCID: Ilya I. Yaichkov – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;
Mikhail K. Korsakov – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;
Anton A. Shetnev – <https://orcid.org/0000-0002-4389-461X>;
Nikita N. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;
Sergey S. Petukhov – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>.

Received: 27.02.2024

Accepted: 27.08.2024

Published: 28.08.2024

Abstract

Introduction. The study of the systemic exposure of a new original drug is an essential part of its preclinical study. 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide is a new selective carbonic anhydrase II inhibitor for the treatment of open-angle glaucoma. Methods for the quantitative determination of this compound and its N-hydroxy- and N-acetyl metabolites in the plasma of laboratory animals have not been previously developed.

Aim. Development and validation of a method of quantitative determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M_1) and N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M_2) in rat and rabbit blood plasma by HPLC-MS/MS.

Materials and methods. Protein precipitation by methanol was applied for sample preparation. 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide was used as an internal standard. A 5 % aqueous solution of ascorbic acid was added to the plasma samples at volume ratio 1:2 to prevent decomposition of N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide. The combination of sodium fluoride and potassium oxalate was selected as an anticoagulant. Chromatographic separation was performed on Zorbax Eclipse Plus C18 column (150 × 3.0 mm, 3.5 μm) with Zorbax Eclipse Plus C18 pre-column (12.5 × 2.1 mm, 5.0 μm) using a mobile phase based on a 0.1 % aqueous solution of formic acid and methanol. Mass spectrometric detection was carried out in the MRM mode using electrospray ionization in negative polarity. The method was tested during a pharmacokinetic study of a 1 % ocular suspension of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide on 6 Wistar rats. Blood samples were collected before administration, as well as 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 216 h after administration. The non-compartment approach was used for calculation pharmacokinetic parameters.

Results and discussion. The developed method has been validated in parameters of selectivity, calibration curve, accuracy and precision, matrix effect, dilution integrity, carry over, reinjection reproducibility, stability. The analytical range of determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide in plasma was 10–4000 ng/ml, M_1 – 1.0–400.0 ng/ml, M_2 – 0.1–40.0 ng/ml. The selected combination of anticoagulant and stabilizer solution allows storage of plasma samples in freezing chamber for 28 days.

Conclusion. The developed method has been fully validated and confirmed its suitability for quantitative determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in the blood plasma of laboratory animals. The method has been successfully used for pharmacokinetic study of 1 % ocular suspension of the drug.

Keywords: HPLC-MS/MS, plasma, stabilization, validation, pharmacokinetics, carbonic anhydrase II inhibitor, N-hydroxysulfonamide

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Ilya I. Yaichkov carried out the development and validation of bioanalytical methods, analysis of animal samples. Mikhail K. Korsakov, Anton A. Shetnev carried out formulation of aims and objectives, the organizational part of the study. Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov carried out the experiment on laboratory animals.

Funding. The article was prepared within the framework of the State assignment of the Yaroslavl State Pedagogical University named after. K. D. Ushinsky for 2024 from the Ministry of Education of Russia on the topic "Development of a new drug for the treatment of neurodegenerative diseases based on a monoamine oxidase inhibitor" (registry entry number 720000Ф.99.1.5Н62АА12000).

For citation: Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Shetnev A. A., Volkhin N. N., Petukhov S. S. Development and validation of the method of quantification of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in laboratory animal plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(3):219–230. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1771>

ВВЕДЕНИЕ

Глаукома является одной из главных причин необратимой слепоты. Повышенное внутриглазное давление (IOP – intraocular pressure) – основной симптом и начальное звено патогенеза данного заболевания. Одним из способов снижения IOP при глаукоме является снижение секреции внутриглазной жидкости за счет ингибирования карбоангидразы II цилиарного тела глаза [1, 2]. 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) (рисунок 1 А) является новым селективным ингибитором карбоангидразы II (iCAII), применяемым в форме 1%-й глазной суспензии. По своей фармакологической активности данное лекарственное средство (ЛС) превосходит ранее разработанные дорзоламид, бринзоламид, а также производные 1,3-оксазола нового поколения [3–5]. TFISA подвергается биотрансформации с образованием двух метаболитов: N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_1) (рисунок 1 Б) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_2) (рисунок 1 В) [6].

Изучение фармакокинетики является обязательной частью доклинического исследования любого ЛС, в том числе и глазных лекарственных форм. Начальным этапом исследования является изучение сис-

темной экспозиции лекарственного вещества и его метаболитов в плазме или сыворотке крови при однократном введении¹. Полученные результаты в дальнейшем служат для определения временных интервалов забора экскретов при изучении элиминации, коррекции временных точек забора органов и тканей при изучении распределения. Биоаналитические методики определения TFISA и его метаболитов M_1 и M_2 в биологических жидкостях ранее не были разработаны. Процесс создания данных методик осложнен высокой реакционной способностью N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_1). Данное вещество способно разлагаться в биологических пробах с образованием сульфокислоты и оксидов азота [7–9]. Для стабилизации близкого по структуре соединения, N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида, применялся 10%-й водный раствор аскорбиновой кислоты. Влияние антикоагулянта на устойчивость этого метаболита в данной работе не изучалось [9].

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с. Доступно по: https://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Zakon_RF/Mironov_Rukovodstvo_po_provedeniju_doklinicheskikh_issledovaniy_lekarstvennykh_sredstv.pdf. Ссылка активна на 27.02.2024.

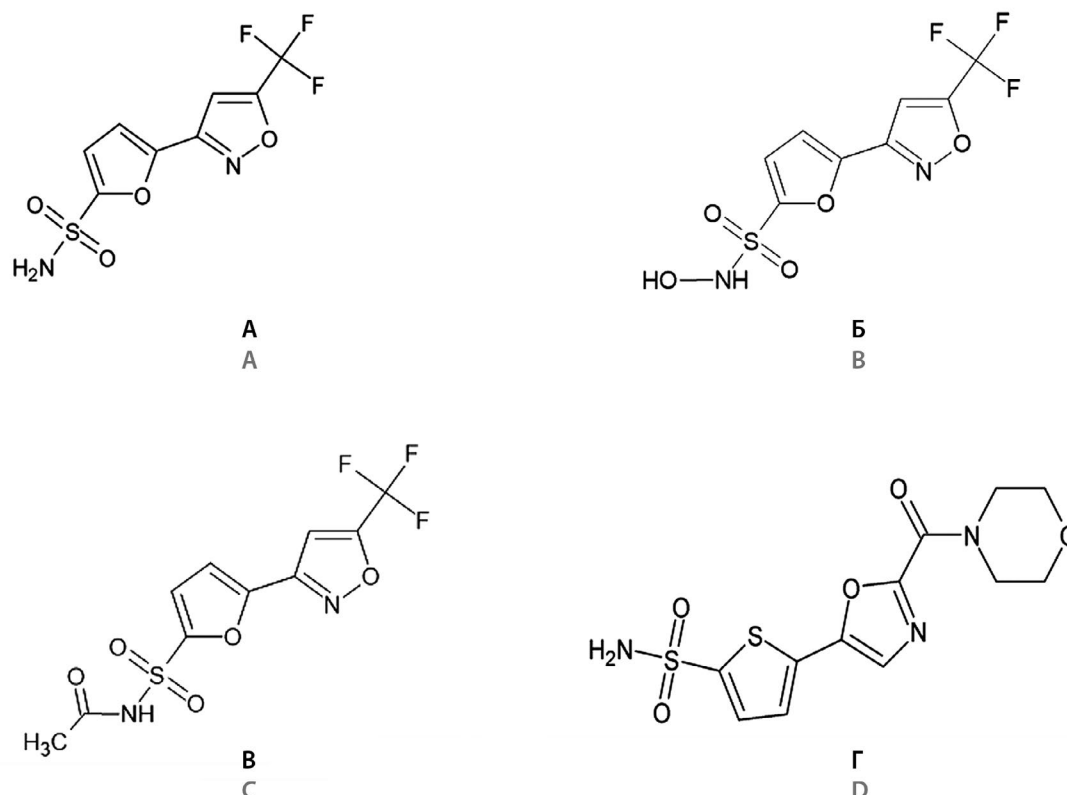


Рисунок 1. Структурные формулы 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (А); N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (Б); N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (В) и 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамида (Г)

Figure 1. The structures of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (A); N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (B); N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (C); 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide (D)

Таким образом, целью исследования является разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме крысы и кролика методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Для количественного определения TFISA и его метаболитов в биологических объектах использовалась ВЭЖХ-МС/МС-система, состоящая из tandemного масс-спектрометрического детектора AB SCIEX QTRAP5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур) и хроматографа 1260 Infinity (Agilent Technologies, Германия; бинарный насос G1312B, автосемплер G1329B с термостатом G1330B, термостат колонок G1316A). Управление прибором осуществлялось с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.2, интегрирование полученных хроматограмм – с помощью программного обеспечения MultiQuant 3.0.5.

Реактивы и стандартные образцы

Для приготовления подвижной фазы применяли метанол (LiChrosolv® hypergrade for LC-MS, Merck KGaA, Германия) и муравьиную кислоту (Optima® LC/MS Grade, Thermo Fisher Scientific, США) качества для ВЭЖХ-МС, а также деионизированную воду, полученную с помощью установки arium® mini (Sartorius AG, Германия). При подборе стабилизатора были опробованы 5%-е и 10%-е водные растворы аскорбиновой кислоты («х.ч.», АО «ЛенРеактив», Россия), натрия сульфита («ч.д.а.», АО «ЛенРеактив», Россия), натрия тиосульфата пентагидрата (≥98 %, Scharlau, Китай), натрия пиросульфита («х.ч.», АО «Химреактивснаб», Россия), а также 250 мМ водный раствор ацетата аммония (HPLC-Grade, High Purity Laboratory Chemicals Pvt. Ltd., Индия) с pH 3,8.

В качестве стандартных образцов использовались субстанции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (99,1 %), N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (98,2 %), N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-ок-

сазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (98,5 %), синтезированных в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова ЯГПУ им. К. Д. Ушинского. С применением данных образцов готовились отдельные стандартные растворы в диметилсульфоксиде («х.ч.», АО «ЛенРеактив», Россия) в концентрации 1000 мкг/мл. В качестве внутреннего стандарта (BC) был выбран близкий по структуре к анализам 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид (98,4 %) (THSA) (рисунок 1 Г), также произведенный в данной лаборатории.

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

Для хроматографического разделения использовалась хроматографическая колонка 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). Для градиентного элюирования применяли 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде и метанол (таблица 1).

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Table 1. Gradient elution conditions

Время, мин Time, min	Скорость потока, мкл/мин Flow rate, µl/min	A, %	B, %
0,0	600	65	35
0,5	600	65	35
2,0	600	35	65
5,0	600	35	65
5,1	600	10	90
7,0	600	10	90
7,1	600	65	35
10,0	600	65	35

Примечание. А – водный раствор муравьиной кислоты 0,1%-й; В – метанол.

Note. A – 0.1 % aqueous formic acid solution; B – methanol.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме MRM в отрицательной полярности (таблица 2). Из-за сильных различий в площадях хроматографических пиков анализатов для количественного определения TFISA использовался SRM-переход внутреннего стандарта 342 → 78 m/z с более интенсивным сигналом, для количественного определения M₁ и M₂ – SRM-переход 342 → 110 m/z с менее интенсивным сигналом.

Подготовка проб

Осаждение белков использовалось в качестве метода пробоподготовки: к 20 мкл плазмы добавляли 100 мкл метанольного раствора THSA в концентрации 0,5 мкг/мл, перемешивали и центрифугировали

5 мин при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в микровставки для виал.

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования

Table 2. Mass spectrometric detection parameters

Аналит Analyte	Тип Type	SRM-переход SRM transition	
		Q1	Q3
TFISA	Количественный Quantitative	281	136
	Контрольный	281	66
M ₁	Количественный Quantitative	297	136
	Контрольный Control	297	66
M ₂	Количественный Quantitative	323	136
	Контрольный Control	323	66
THSA (внутренний стандарт)	BC для TFISA IS for TFISA	342	78
THSA (Internal standard)	BC для M ₁ , M ₂ IS for M ₁ , M ₂	342	110

Примечание. Количественные SRM-переходы использовались для количественных расчетов; контрольные SRM-переходы использовались для подтверждения корректности идентификации.

Note. Quantitative SRM-transitions were used for quantitative calculations; control SRM transitions were used to confirm the correctness of identification.

Для приготовления калибровочных образцов (K1–K8), образцов контроля качества (LQC, MQC, HQC) и образцов для теста разведения (Dil) к 95 мкл плазмы добавляли 5 мкл комбинированного рабочего раствора с концентрацией, в 20 раз превышающей концентрации анализата в данных пробах (таблица 3). Затем в образец вносили раствор стабилизатора

Валидация методики

Валидация разработанной методики проводилась по показателям «селективность», «градуировочная кривая», «правильность и прецизионность», «эффект разведения образца», «эффект матрицы», «перенос из предыдущей пробы», «стабильность» согласно Решению Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85¹. Также была дополнительно подтверждена воспроизводимость при повторном введении аналитической серии и стабильность в цельной крови согласно указаниям

¹ Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85. 2016. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 12.12.2023.

руководства ICH M10¹. Значения концентраций калибровочных образцов (K1–K8), образцов контроля качества (LQC, MQC, HQC) и образцов для теста разведения (Dil) приведены в таблице 3.

Таблица 3. Концентрации 5-[5-(трифторметил)-1,2-окс азол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в калибровочных образцах и образцах контроля качества

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

Образец Sample	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/ml		
	TFISA	M ₁	M ₂
K1 (LLOQ)	10	1	0.1
K2	50	5	0.5
K3	250	25	2.5
K4	500	50	5.0
K5	1000	100	10.0
K6	2000	200	20.0
K7	3000	300	30.0
K8	4000	400	40.0
LQC	30	3	0.3
MQC	1500	150	15.0
HQC	3500	350	35.0
Dil	7000	700	70.0

Дизайн фармакокинетического эксперимента

Исследование фармакокинетики глазной суспензии TFISA с концентрацией 1 % проводилось на 6 крысах породы Wistar массой 216,17 ± 26,69 г (среднее значение ±SD), полученных из питомника ООО «СМК СТЕЗАР». В изучаемую группу вошли 3 самца и 3 самки. Животные были предварительно катетеризованы в правую яремную вену. Введение производилось путем инстилляции глазной суспензии ЛС. Объем введения в каждый глаз определялся из соотношения 40 мкл препарата на среднюю массу крыс 216,17 г – 0,185 мкл/г в каждый глаз. Забор образцов крови в количестве 0,2 мл выполнялся до введения (холостая проба) и через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 144 ч, 216 ч после введения. В качестве антикоагулянта была использована комбинация натрия фторида и калия оксалата. Каждую пробу разделяли на 2 части: 50 мкл цельной крови отбирали и замораживали до температуры

не выше –70 °С для изучения системной экспозиции данных соединений в крови. Оставшуюся часть центрифугировали в течение 10 мин при 2500 об/мин, отделяли плазму, добавляли 5%-й раствор аскорбиновой кислоты и замораживали. При оценке фармакокинетических параметров TFISA, M₁ и M₂ применяли некомпартментный подход. Рассчитывались следующие фармакокинетические константы с помощью пакета R v. 3.3.2, модуль Bear v. 2.7.7: максимальная концентрация ЛС в плазме (C_{max}); время достижения максимальной концентрации ЛС в плазме (T_{max}); площадь под фармакокинетической кривой, начиная с момента приема препарата до времени отбора последнего образца крови (AUC_{0–t}); площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности (AUC_{0–∞}); константа элиминации (k_e); период полувыведения ЛС (T_{1/2}); среднее время удержания ЛС в крови (среднее резидентное время, MRT). Описательная статистика [среднее значение, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), стандартная ошибка среднего (SEM)] рассчитывалась с помощью ПО StatSoft STATISTICA 10.0.1011.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе разработки проводили подбор комбинации антикоагулянта и раствора стабилизатора для предотвращения разложения основного метаболита N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида. Растворы антиоксидантов и ацетата аммония (pH = 3,8, 250 мМ) добавлялись к плазме, содержащей K₃-ЭДТА, гепаринат лития или натрия фторид/калия оксалат (NaF/K₂C₂O₄), в объемном соотношении 1:5. На данной стадии исследования оценивались краткосрочная стабильность в плазме (STS) (24 ч при комнатной температуре), стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) в плазме, а также стабильность приготовленных проб в автосемплере (ASS) (24 ч при +4 °С) на уровне концентрации HQC. Расчеты проводились методом внешнего стандарта относительно свежеприготовленной пробы. На этапе скрининга анализировалось по 2 образца на изучаемую комбинацию: один образец – из плазмы кролика, второй образец – из плазмы крысы. В объемном соотношении 1:5 не удалось достичь приемлемого результата, поэтому проводился эксперимент с объемным соотношением 1:2 с наиболее перспективными растворами аскорбиновой кислоты (АК) и ацетата аммония (АЦА) (рисунк 2). При применении растворов Na₂SO₃, Na₂S₂O₃, Na₂S₂O₅ в испытаниях STS наблюдалось практически полное разложение аналита. Поэтому на 2 стадии их не использовали. Наилучшие результаты наблюдались при добавлении АК к плазме с гепаринатом лития и NaF/K₂C₂O₄. Для подтверждающего испытания, в ходе которого анализировалось дополнительно 4 образца (2 образца из плазмы кролика и 2 образ-

¹ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 12.12.2023.

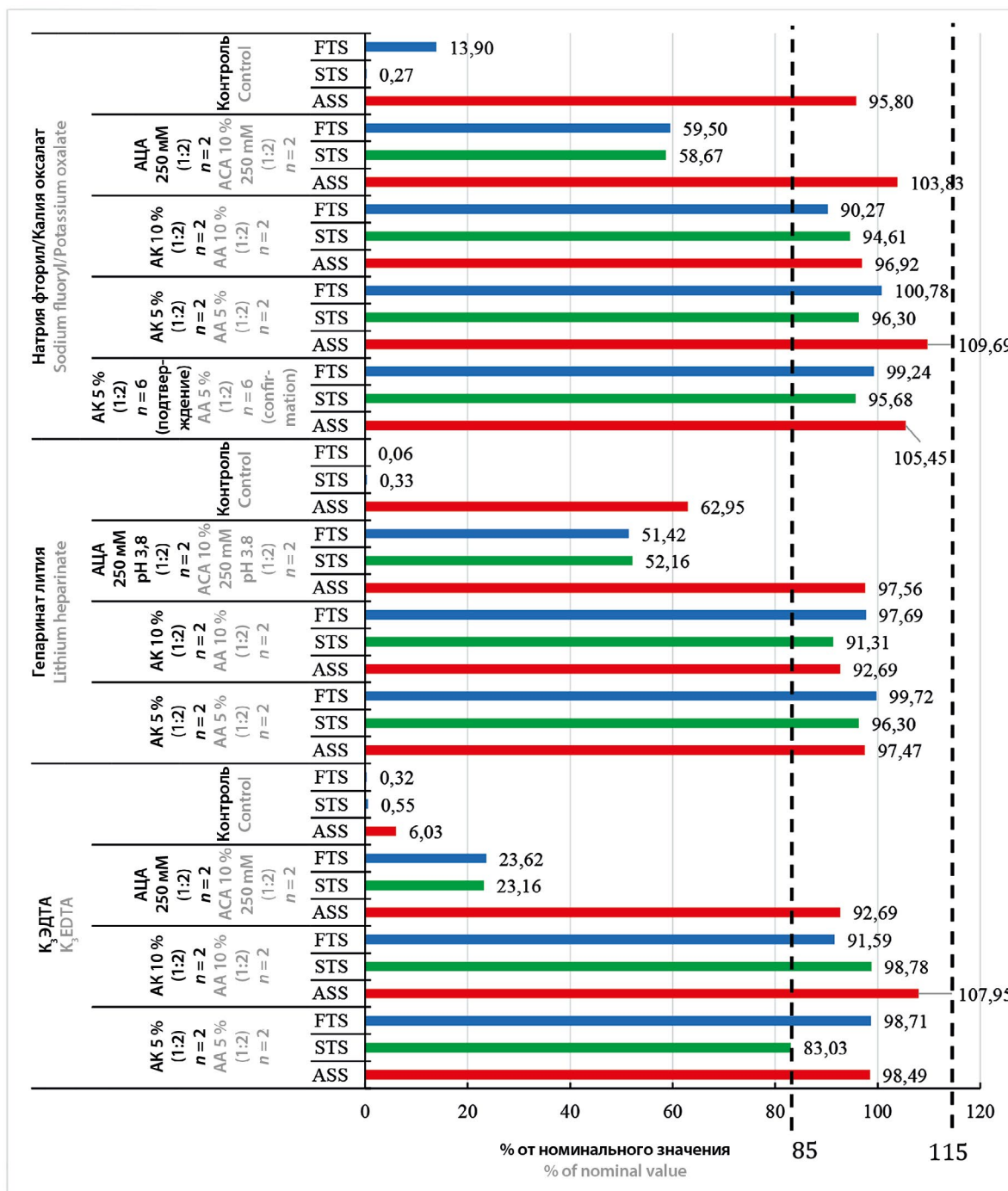


Рисунок 2. Результаты предварительного изучения стабильности M_1

Figure 2. The results of a preliminary stability study of M_1

ца из плазмы крысы), был выбран 5%-й раствор АК в комбинации с $\text{NaF/K}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Результаты укладывались в требуемый диапазон $\pm 15\%$ от номинального значения. Выбор антикоагулянта основан на результатах изучения стабильности M_1 в цельной крови (таблица 4), которые позволили обойтись без применения дополнительных стабилизаторов при хранении ее проб.

На следующем этапе проводилась валидация разработанной методики. Селективность оценивалась отдельно для обоих видов животных совместно с испытанием прецизионности и правильности (таблица 4). На хроматограммах холостого образца площадь хроматографического пика TFISA не превышала 20% от площади хроматографического пика в образце

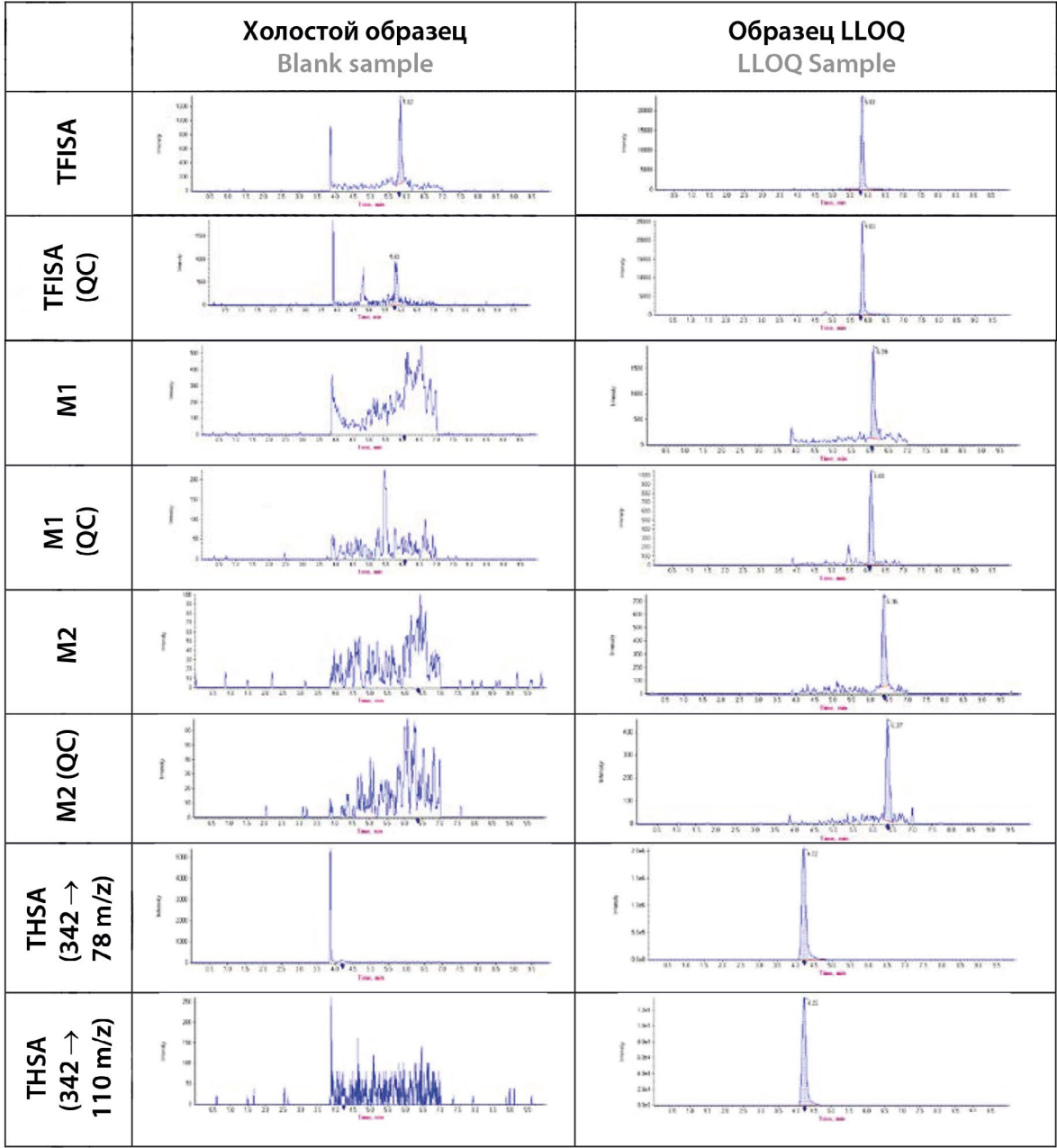


Рисунок 3. Примеры хроматограмм холостого образца стабилизированной плазмы крысы и образца на уровне концентраций LLOQ

Figure 3. Examples of chromatograms of a blank sample of stabilized rat plasma and a LLOQ sample

LLOQ (рисунок 3). Аналитический сигнал других соединений в интактных пробах отсутствовал. Зависимость соотношения площадей пиков «аналит/ВС» от концентрации TFISA, M₁ и M₂ носила линейный характер (рисунок 4). Оценка матричных эффектов проводилась как согласно требованиям нормативного документа ЕАЭС путем расчета коэффициента вариации нормализованного фактора матрицы (NMF) (таблица 5), так и согласно международным требованиям путем оценки правильности и прецизионности рас-

считанных концентраций (таблица 4). Испытание вторым способом проводилось в рамках аналитической серии по оценке правильности и прецизионности. При проведении обоих тестов готовилось по 6 образцов контроля качества на нижнем и на верхнем уровне концентраций (таблица 5) с применением пулов плазмы, полученных от 6 разных животных, включая гемолизированную плазму. Результаты оценки матричных эффектов для каждого аналита соответствовали установленным требованиям.

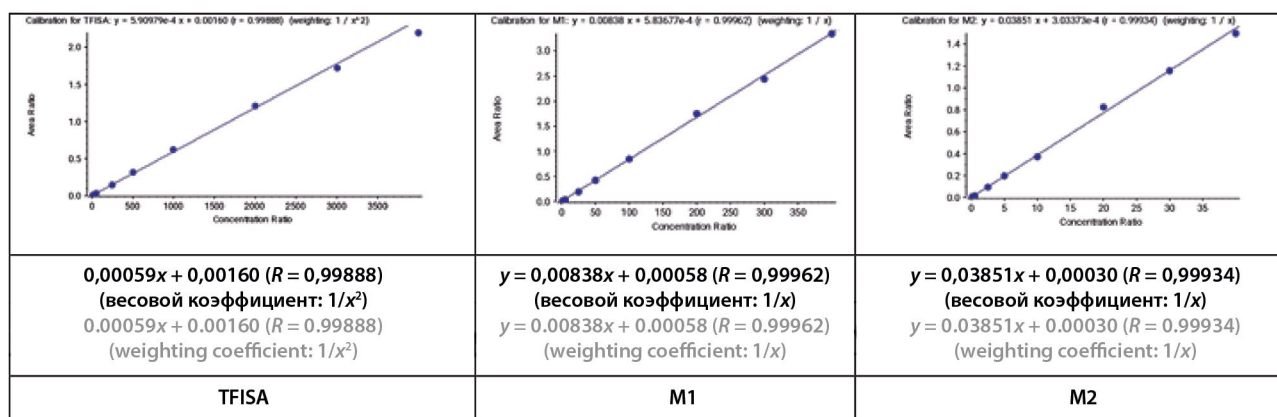


Рисунок 4. Примеры калибровочных кривых изучаемых соединений

Figure 4. Examples of calibration curves of the studied compounds

Таблица 4. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме

Table 4. The results of evaluation of accuracy and precision of the method of determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in plasma

Испытание Test		Концентрация Concentration	TFISA		M ₁		M ₂	
			δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %
Внутрисерийная правильность и прецизионность Intraday accuracy and precision	Серия 1 Batch 1	LLOQ	−0,03	3,02	2,67	4,88	−3,33	8,45
		LQC	−1,16	8,71	−4,56	5,93	0,00	9,89
		MQC	2,93	2,63	2,25	4,26	3,07	10,63
		HQC	−9,00	4,53	−7,71	4,77	−13,17	4,13
	Серия 2 Batch 2	LLOQ	−5,30	5,13	12,67	3,71	8,33	6,95
		LQC	9,72	3,18	8,28	3,57	12,22	4,47
		MQC	10,70	3,42	7,93	2,23	11,73	2,48
		HQC	−1,13	3,46	2,27	3,30	6,91	2,43
	Серия 3 Batch 3	LLOQ	1,83	3,76	−7,50	5,50	−3,33	10,68
		LQC	4,45	4,38	−1,89	8,35	2,78	7,23
		MQC	4,87	5,82	2,97	6,91	−0,97	5,46
		HQC	−7,10	4,55	−3,87	3,92	−1,68	5,65
	Серия 4 Batch 4	LLOQ	−15,48	5,72	−2,17	12,41	−3,33	15,58
		LQC	−5,10	8,75	4,56	5,33	10,00	3,32
		MQC	7,03	3,05	7,56	3,02	12,87	2,90
		HQC	−5,73	5,41	0,99	3,40	7,86	2,71
Межсерийная правильность и прецизионность Interday accuracy and precision		LLOQ	−4,75	8,31	1,42	10,08	−0,42	11,27
		LQC	1,98	8,27	1,60	7,53	6,25	7,76
		MQC	6,38	4,59	5,18	4,81	6,68	7,94
		HQC	−5,74	5,26	−2,08	5,49	−0,02	9,35
Воспроизводимость при повторном вводе серии (48 ч) Reinjection reproducibility (48 h)		LLOQ	−8,13	14,73	−1,67	13,10	−1,67	17,52
		LQC	2,79	4,74	4,33	6,46	8,33	11,47
		MQC	0,61	2,17	−1,39	2,53	2,30	2,63
		HQC	−11,82	4,46	−6,53	5,89	−3,01	4,88
Эффект разведения образца Dilution integrity		Dil	−10,37	4,60	−8,07	4,25	−0,32	6,35

Примечание. Серии 1 и 2 выполнены на плазме крысы, серии 3 и 4 выполнены на плазме кролика; в рамках серий 2 и 4 выполнялась изучение селективности методики и эффекта матрицы согласно ICH M10.

Note. Series 1 and 2 were performed on rat plasma, series 3 and 4 were performed on rabbit plasma; selectivity of the method and the matrix effect according to ICH M10 were studied within series 2 and 4.

Таблица 5. Оценка эффекта матрицы методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме

Table 5. Evaluation of matrix effect of the method of determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in plasma

Объект Subject	Показатель Parameter	TFISA		M ₁		M ₂	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Плазма крысы Rat plasma	NMF	0,811	0,725	0,753	0,708	0,809	0,774
	RSD (NMF), %	5,77	3,55	5,99	3,38	5,26	3,95
Плазма кролика Rabbit plasma	NMF	0,789	0,727	0,767	0,739	0,839	0,789
	RSD (NMF), %	7,30	4,34	1,87	6,22	2,50	5,88

При изучении правильности и прецизионности методики анализировалось по 2 серии на модельных пробах крыс и кроликов (таблица 4). При этом было приготовлено по 6 образцов каждой концентрации (таблица 5). Величина относительной погрешности (δ) определения TFISA, M₁ и M₂ укладывалась в диапазон $\pm 15\%$ на уровнях LQC, MQC, HQC, величина RSD не превышала 15 %. Для уровня концентраций LLOQ значение δ было в пределах $\pm 20\%$, значение RSD – менее 20 % для каждого аналита. Близкие величины NMF в образцах данных животных (таблица 5) позволили объединить результаты внутрисерийных тестов при оценке межсерийной правильности и прецизионности. Двукратное разведение пробы холостым образцом не влияло на метрологические характеристики методики (таблица 4). Перенос аналитов и внутреннего стандарта из

Выполненные валидационные испытания краткосрочной стабильности, стабильности после 3 циклов заморозки/разморозки, стабильности в приготовленных пробах в автосемплере, долгосрочной стабильности в морозильной камере при температуре не вы-

ше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LTS) соответствуют установленным требованиям (таблица 6). На каждом уровне концентраций было приготовлено по 6 образцов на плазме крысы. Дополнительные исследования с применением биологических объектов кролика не проводились ввиду приемлемого результата предварительных испытаний (см. рисунок 2), в ходе которых различий в стабильности в плазме обоих видов животных не выявлено. При повторном введении аналитической серии спустя 48 ч правильность и прецизионность измерений сохраняются. Таким образом, использованная комбинация антиоксиданта и антикоагулянта предотвращают разложение M₁ при хранении образцов плазмы.

Методика была апробирована во время изучения фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в форме 1%-й глазной суспензии при однократном введении крысам. Полученные значения фармакокинетических параметров TFISA и его метаболитов представлены в таблице 7, их фармакокинетические профили – на рисунке 5.

Таблица 6. Изучение стабильности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме

Table 6. Stability study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in plasma

Испытание Test	Температурный режим Temperature mode	% от номинального значения % from nominal value					
		TFISA		M ₁		M ₂	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
STS	Комнатная температура (24 ч) Room temperature (24 h)	-6,32	-8,17	-2,11	-8,10	-0,56	-7,43
FTS	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 ч) / комнатная температура (4 ч) No higher than $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 h) / room temperature (4 h)	-3,85	-9,37	-6,17	-3,29	2,22	-11,80
ASS	Не выше $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (48 ч) No higher than $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (48 h)	-2,56	-13,01	-1,78	-9,99	2,78	-3,68
LTS	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28 дней) No higher than $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28 days)	7,88	9,82	6,39	12,09	0,49	10,74
Стабильность в цельной крови Stability in whole blood	Комнатная температура (24 ч) Room temperature (24 h)	5,72	-8,78	3,92	-9,57	0,22	4,69

Таблица 7. Фармакокинетические параметры 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в плазме крови крысы

Table 7. The pharmacokinetic parameters of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat plasma

Параметр Parameter		$C_{\max}$, нг/мл $C_{\max}$, ng/ml	$T_{\max}$, ч $T_{\max}$, h	AUC_{0-t} , нг·ч/мл AUC_{0-t} , ng·h/ml	$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл $AUC_{0-\infty}$, ng·h/ml	$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	K_{el} , ч ⁻¹ K_{el} , h ⁻¹	MRT, ч MRT, h
TFISA (n = 6)	Среднее значение Mean	267,93	2,58	7600,67	8828,70	72,08	0,0110	56,42
	SD	109,50	2,06	3916,50	3753,07	30,79	0,0040	10,37
	RSD	40,87	79,72	51,53	42,51	42,72	36,66	18,38
	SEM	44,70	0,84	1598,90	1532,18	12,57	0,0016	4,23
M_1 (n = 6)	Среднее значение Mean	24,45	7,67	374,65	403,09	14,20	0,0537	16,42
	SD	10,53	2,34	82,19	71,40	4,98	0,0175	3,70
	RSD	43,06	30,50	21,94	17,71	35,12	32,63	22,51
	SEM	4,30	0,95	33,56	29,15	2,04	0,0071	1,51
M_2 (n = 6)	Среднее значение Mean	3,04	2,75	33,95	37,53	18,38	0,0415	14,95
	RSD	0,76	1,08	11,30	12,00	5,88	0,0147	2,84
	CV	24,94	39,42	33,28	31,98	32,01	35,30	19,02
	SEM	0,31	0,44	4,61	4,90	2,40	0,0060	1,16

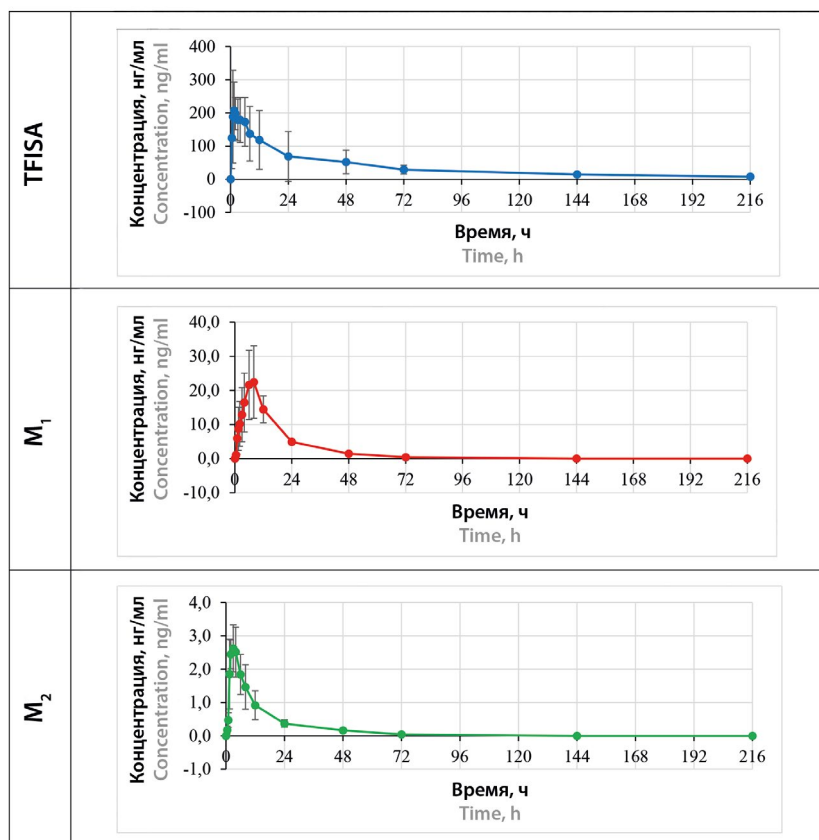


Рисунок 5. Усреднённые фармакокинетические кривые (со стандартными отклонениями) 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в плазме крови крысы

Figure 5. Averaged pharmacokinetic curves (with standard deviations) of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat blood plasma

Полученные значения фармакокинетических параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ TFISA имеют высокие значения коэффициентов вариации. Максимальная концентрация данного соединения достигается в промежутке 0,5–6 ч после введения. Изучаемое ЛС имеет достаточно длительный период полувыведения – 72,08 ч, что может быть связано с его возможным депонированием в эритроцитах (таблица 7). Так, концентрации в крови близкого по структуре iCAII 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида более чем в 30 раз выше, чем в плазме [9]. Дорзоламид и бринзоламид также накапливаются в эритроцитах [4, 5].

Максимальная концентрация M_1 составляет $24,45 \pm 10,53$ нг/мл (среднее значение $\pm SD$), что значительно выше, чем $C_{\max}$ M_2 . Она достигается через $7,67 \pm 2,34$ ч (среднее значение $\pm SD$) после введения. Это приблизительно на 5,5 ч позже $T_{\max}$ 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида. Концентрация M_2 достигает максимальных значений спустя $2,75 \pm 1,08$ ч после глазной инстилляции ЛС, что близко к величине $T_{\max}$ TFISA. Параметры AUC_{0-t} метаболитов имеют меньшую вариабельность: их величина CV не превышает 34 %. Также M_1 и M_2 имеют более быстрый период полувыведения – 14,20 ч и 18,38 ч соответственно (таблица 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в плазме крови крысы и кролика прошла полную валидацию по показателям «селективность», «калибровочная зависимость», «правильность и прецизионность внутри цикла и между циклами», «эффект разведения», «эффект переноса из предыдущей пробы», «эффект матрицы», «воспроизводимость при повторном введении аналитической серии», «стабильность». Применение комбинации натрия фторида и калия оксалата в качестве антикоагулянта, а также добавление к пробам 5 % раствора аскорбиновой кислоты в объемном соотношении 1:2 гарантирует стабильность основного метаболита N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида в образцах плазмы как минимум в течение 28 дней хранения в морозильной камере. Методика успешно апробирована при изучении фармакокинетики при однократном введении глазной суспензии TFISA крысам. Установлено, что основным метаболитом исследуемого препарата является его N-гидроксипроизводное, а N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламид образуется в значительно меньших количествах. Длительный период полувыведения лекарственного препарата указывает на его воз-

можное депонирование в эритроцитах. В дальнейшем разработанная методика будет использована для анализа проб крыс после внутрибрюшинного введения TFISA с целью оценки абсолютной биодоступности, а также многократной глазной инстилляции. Для выявления межвидовых различий планируется проведение исследования фармакокинетики изучаемого препарата на кроликах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kuryshva N.I. Carbonic Anhydrase Inhibitors in the Treatment of Glaucoma. Review. Part II. *Ophthalmology in Russia*. 2020;17(4):676–682. (In Russ.) DOI: 10.18008/1816-5095-2020-4-676-682.
2. Popovic M.M., Schlenker M.B., Thiruchelvam D., Redelmeier D.A. Serious Adverse Events of Oral and Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *JAMA Ophthalmology*. 2022; 140(3):235–242. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2021.5977.
3. Khokhlov A.L., Shetnev A.A., Korsakov M.K., Fedorov V.N., Tyushina A.N., Volkhin N.N., Vdovichenko V.P. Pharmacological properties of sulfonamide derivatives – new inhibitors of carbonic anhydrase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;175(2):166–170. (In Russ.) DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-2-166-170.
4. Lo Faro A.F., Tini A., Gottardi M., Pirani F., Sirignano A., Giorgetti R., Busard F.P. 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 Testing and Analysis*. 2021;13(8):1552–1560. DOI: 10.1002/dta.3055.
5. Madrewar A.B., Deshpande A., Bhattacharya S. Mini-Review on Bioanalytical Estimation of Brinzolamide. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2022;18(3):265–272. DOI: 10.2174/1573412917666210812103414.
6. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Shetnev A.A., Ivanovsky S.A., Korsakov M.K., Alexeev M.A., Gasilina O.A., Volkhin N.N., Petukhov S.S. Identification and synthesis of metabolites of the new antiglaucoma drug. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(1):53–66. DOI: 10.18413/rpharmacology.10.431.
7. Raghuvanshi D.S., Verma N. An iodine-mediated new avenue to sulfonylation employing N-hydroxy aryl sulfonamide as a sulfonylating agent. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2021;19:4760–4767. DOI: 10.1039/d1ob00036e.
8. Wang F.-X., Zhou S.-D., Wang C., Tian S.-K. N-Hydroxy sulfonamides as new sulfonylating agents for the functionalization of aromatic compounds. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2017;15(25):5284–5288. DOI: 10.1039/c7ob01390f.
9. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Korsakov M.K., Shetnev A.A., Volkhin N.N., Petukhov S.S. 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. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(4):53–64. DOI: 10.18413/rpharmacology.9.10056.