

Оригинальная статья / Research article



УДК 615.03; 543.51 + 543.54

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-1916>

Изучение экскреции нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамид

И. И. Яичков^{1,2}✉, М. К. Корсаков², Н. Н. Вольхин¹, В. Е. Зайкова^{1,2}, О. Э. Лазарянц^{1,2}

¹ 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

² 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

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

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

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

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

В. Е. Зайкова – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;

О. Э. Лазарянц – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Статья поступила: 27.08.2024

Статья принята в печать: 12.03.2025

Статья опубликована: 14.03.2025

Резюме

Введение. Новый селективный ингибитор PAR-2-рецепторов, 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004), находится на стадии доклинического исследования. Изучение экскреции R004 и его метаболитов ранее не проводилось.

Цель. Изучение экскреции R004 и его метаболитов с мочой и калом после однократного перорального и внутрибрюшинного введения субстанции.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 2 группах крыс линии Wistar по 6 особей. Первой группе субстанция R004 вводилась перорально в дозировке 10 мг/кг, второй группе – внутрибрюшинно в дозировке 10 мг/кг. Забор биоматериала проводился с помощью метаболических клеток. Пробы мочи отбирались до введения препарата и в промежутки 0–4, 4–8, 8–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120 ч после введения. Пробы фекалий отбирались до введения препарата и в промежутки 0–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120 ч. Анализ образцов проводился с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты и обсуждение. Аналитический диапазон методики определения R004 и 4-метокси-3-(трифторметил)-анилина (M2) в моче составил 5–2000 нг/мл, а 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1) – 100–40 000 нг/мл. В фекалиях концентрации R004 измеряли в диапазоне 0,5–500,0 мкг/г, M1 – 4–4000 нг/г, M2 – 40–40 000 нг/г. Основная часть лекарственного средства и метаболитов выводится в течение 48 ч после введения. Полная элиминация достигается спустя 96 ч. R004 экскретируется в неизменном виде только с фекалиями: 94,83 ± 0,78 % при пероральном введении и 57,63 ± 0,66 % при внутрибрюшинном введении (M + m). Метаболит M1 выводится преимущественно ренальным путем, метаболит M2 – преимущественно через кишечник.

Заключение. Биоаналитические методики определения R004, M1 и M2 в моче и кале были успешно валидированы. Большая часть R004 экскретируется в неизменном виде энтеральным путем. M1 выводится преимущественно с мочой, M2 – с фекалиями.

Ключевые слова: ингибитор PAR-2-рецепторов, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика, экскреция, моча, фекалии, крысы

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

Вклад авторов. И. И. Яичков проводил разработку и валидацию биоаналитических методик, анализ образцов животных. М. К. Корсаков отвечал за формулирование целей и задач, организационную часть исследования. Н. Н. Вольхин, В. Е. Зайкова, О. Э. Лазарянц отвечали за работу с лабораторными животными.

© Яичков И. И., Корсаков М. К., Вольхин Н. Н., Зайкова В. Е., Лазарянц О. Э., 2025

© Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Volkhin N. N., Zaykova V. E., Lasaraynz O. E., 2025

Финансирование. Статья подготовлена в рамках государственного задания Ярославского государственного педагогического университета им. К. Д. Ушинского на 2024 год от Минпросвещения РФ 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., Вольхин Н. Н., Зайкова В. Е., Лазарянц О. Э. Изучение экскреции нового производного 4,5-дигидроизохазол-5-карбоксамид. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2025;14(2):193–203. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-1916>

The excretion study of a new derivative of 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide

Ilya I. Yaichkov^{1,2}✉, Mikhail K. Korsakov², Nikita N. Volkhin^{1,2}, Valeria E. Zaykova^{1,2}, Olga E. Lasaraynz^{1,2}

¹ 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

² Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky. M. V. Dorogov Pharmaceutical Technology Transfer Center. 108/1, Respublikanskaya 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>;
Nikita N. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;
Valeria E. Zaykova – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;
Olga E. Lasaraynz – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Received: 27.08.2024

Accepted: 12.03.2025

Published: 14.03.2025

Abstract

Introduction. The new selective inhibitor of PAR-2 receptors, 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide (R004), is at the stage of preclinical trial. The excretion of R004 and its metabolites has not been studied before.

Aim. Investigation of excretion of R004 and its metabolites in urine and feces after a single oral and intraperitoneal administration of substance.

Materials and methods. The study was carried out on 2 groups of 6 Wistar rats. The R004 substance was administered orally to the first group at a dosage of 10 mg/kg, to the second group intraperitoneally at a dosage of 10 mg/kg. Biomaterial sampling was carried out with using metabolic cages. Urine was collected before administration of the drug and in the intervals of 0–4, 4–8, 8–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120 h after administration. Feces were collected before administration of the drug and in the intervals of 0–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120 h. The samples were analyzed using HPLC-MS/MS.

Results and discussion. The analytical range of the urine quantification method for R004 and 4-methoxy-3-(trifluoromethyl)aniline (M2) was 5–2000 ng/ml, and 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxylic acid (M1) – 100–40 000 ng/ml. In feces concentrations of R004 were measured in the range of 0.5–500.0 µg/g, M1 – 4–4000 ng/g, M2 – 40–40 000 ng/g. The main part of the drug and metabolites was excreted within 48 h after administration. Complete elimination was achieved after 96 h. R004 is excreted unchanged only with feces: 94.83 ± 0.78 % after oral administration and 67.04 ± 0.59 % after intraperitoneal administration (*M + m*). The metabolite M1 is mainly excreted by renal route, the metabolite M2 is mainly excreted through intestine.

Conclusion. Bioanalytical methods for determination of R004, M1 and M2 in urine and feces have been successfully validated. Most part of the R004 is eliminated unchanged by enteric route. M1 is excreted mainly in urine, M2 – mainly in feces.

Keywords: PAR-2 receptor inhibitor, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics, excretion, urine, feces, rats

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 carried out formulation of aims and objectives, the organizational part of the study. Nikita N. Volkhin, Valeria E. Zaykova, Olga E. Lasaraynz 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 the Russian Federation 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.БН62АА12000).

For citation: Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Volkhin N. N., Zaykova V. E., Lasaraynz O. E. The excretion study of a new derivative of 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide. *Drug development & registration.* 2025;14(2):193–203. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-1916>

ВВЕДЕНИЕ

Новое фармакологически активное соединение 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004) (рисунок 1) находится на стадии доклинического исследования. Данная молекула является низкомолекулярным селективным ингибитором PAR-2-рецепторов и предназначена для терапии ревматоидного артрита. Фармакологическая активность R004 показана на модели формальдегидиндуцированного отека на крысах [1]. Его противовоспалительный эффект выше, чем у других производных 4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамидов и диклофенака натрия [1].

В ходе биотрансформации изучаемого соединения образуется два продукта гидролиза: 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновая кислота (M1) и 4-метокси-3-(трифторметил)анилин (M2) [2] (рисунок 1). Данные метаболиты, а также действующее вещество обладают линейной фармакокинетикой при пероральном введении крысам в диапазоне доз 10–40 мг/кг [3].

Изучение ренальной и внеренальной экскреции R004 ранее не проводилось. Исследование проб мочи при этом обязательно для расчета количества лекарственного средства (ЛС) и его метаболитов, выведенных через почки. При оценке внеренального пути возможно ограничиться анализом образцов кала, как в работах М. Р. М. Letertre с соавторами [4], S. Šturm с соавторами [5], С. Ма с соавторами [6], J. Qiu с соавторами [7], С. Н. Song с соавторами [8]. Для данных целей необходимо адаптировать биоаналитическую методику, использованную для определения R004, M1 и M2 в пробах плазмы животных [3]. Наиболее часто изучение экскреции проводят на том же виде животного, что и изучение системной экспозиции и распределения [6–8]. Поэтому данная работа будет выполнена на крысах.

В ходе исследования биотрансформации, которое проводилось с помощью внутрибрюшинной инъекции суспензии R004, в пробах фекалий крыс идентифицировано действующее вещество в неизменном виде. В моче данный анализ обнаружен не был [2]. Установлено также наличие энтерогепатической рециркуляции R004 [3]. При пероральном введении невозможно отличить выведенное с фекалиями в неизменном виде ЛС от невсосавшегося ЛС. Поэтому дополнительно будет проведено изучение экскреции R004 после внутрибрюшинной инъекции. Также это поможет дифференцировать экскретировавшиеся метаболиты от метаболитов, образовавшихся в ходе гидролиза при пресистемной элиминации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аналитическое оборудование и стандартные образцы

Измерение концентраций R004 и его метаболитов осуществляли на хромато-масс-спектрометре, состоящем из жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Германия) и tandemного масс-спектрометрического детектора QTRAP 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур); программное обеспечение Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, США). Интегрирование хроматограмм проводилось с помощью программного пакета MultiQuant 3.0.5 (AB SCIEX, США).

В качестве стандартных образцов аналитов использовали субстанции 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (99,2%), 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (99,3%) (оба – ЦТФТ им. М. В. Дорогова ЯГПУ им. К. Д. Ушинского, Россия), 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (99,0%, Alfa Aesar, США).

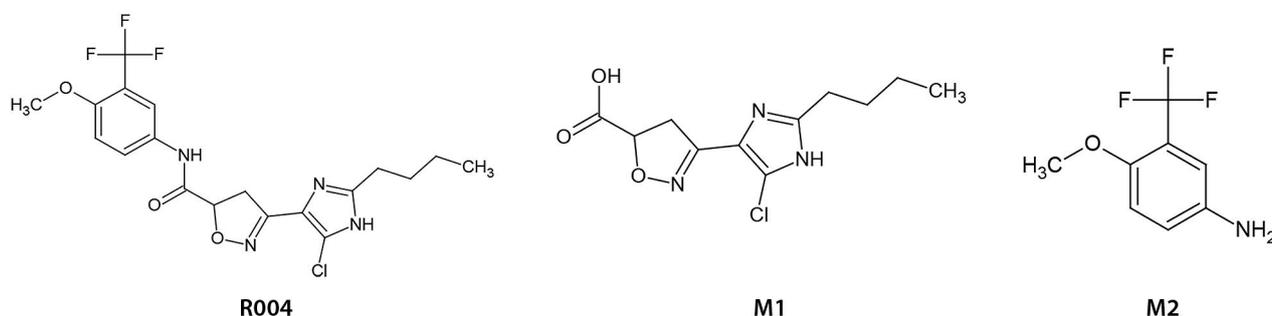


Рисунок 1. Структурные формулы 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004) и его основных метаболитов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1) и 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (M2)

Figure 1. The structure of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxylic acid (M1) and 4-methoxy-3-(trifluoromethyl)aniline (M2)

Раствор внутренних стандартов (ВС) готовился с применением субстанций 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[3,4-диметилфенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R002) (98,5%, ЦТФТ им. М. В. Дорогова ЯГПУ им. К. Д. Ушинского, Россия) и 4-хлоранилина (4CA) (рисунок 2).

Подготовка проб

Калибровочные образцы и образцы контроля качества (КК) мочи готовились путем добавления 10 мкл рабочего раствора аналитов в диметилсульфоксиде (х.ч., АО «ЭКОС-1», Россия) к 190 мкл холостого образца. Затем к смеси добавляли 40 мкл 250 мМ раствора ацетата аммония (HPLC-grade, High Purity Laboratory Chemicals Pvt. Ltd., Индия) с pH = 4,0 для предотвращения гидролиза R004 [2]. Концентрации градуировочных (K1–K8) проб, образцов КК нижнего (LQC), среднего (MQC) и верхнего (HQC) уровней концентраций и образцов для теста разведения (Dil) приведены в таблице 1. Пробоподготовку осуществляли путем разведения 25 мкл стабилизированной мочи 200 мкл ацетонитрильного раствора R002 и 4CA. Концентрация обоих ВС составляла 40 нг/мл. Далее смесь перемешивали на вортексе и центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин.

К холостым образцам фекалий крыс добавляли ацетонитрил в соотношении 1:3 (масса/объем) и 1 шарик из нержавеющей стали ($d = 5$ мм). Смесь гомогенизировалась в течение 1 мин на гомогенизаторе Homogenizer Bioprep-6 (Allsheng, Китай) и центрифугировалась 5 мин при 3000 об/мин. К 190 мкл супернатанта добавляли 10 мкл комбинированного рабочего раствора R004, M1 и M2. Дополнительных мер по стабилизации образцов не требовалось [2]. Для пробоподготовки 50 мкл центрифугированного гомогената смешивали с 300 мкл ацетонитрильного раствора ВС, перемешивали и центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин.

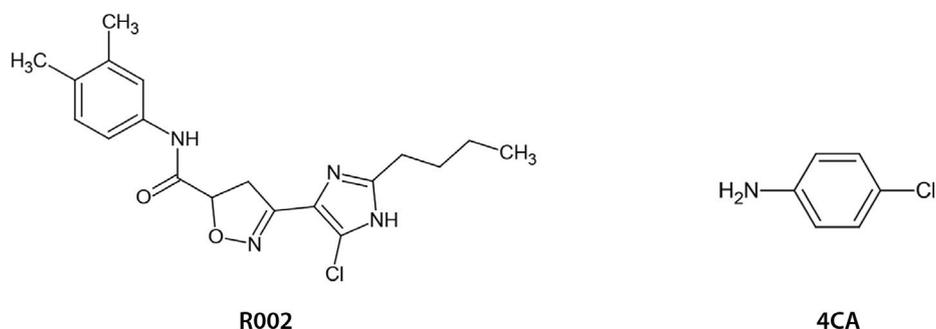


Рисунок 2. Структурные формулы внутренних стандартов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[3,4-диметилфенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R002) и 4-хлоранилина (4CA)

Figure 2. Structural of internal standards of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[3,4-dimethylphenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide (R002) and 4-chloroaniline (4CA)

Таблица 1. Концентрации 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов в калибровочных образцах и образцах контроля качества мочи и фекалий

Table 1. Concentrations of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazol-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in calibration and quality control samples of urine and feces

Образец Sample	Моча Urine			Фекалии Feces		
	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/ml			Концентрация, нг/г Concentration, ng/g		
	R004	M1	M2	R004	M1	M2
K1 (LLOQ)	5	100	5	500	4	40
K2	25	500	25	2500	20	200
K3	100	2000	100	12 500	100	1000
K4	250	5000	250	50 000	400	4000
K5	500	10 000	500	125 000	1000	10 000
K6	1000	20 000	1000	250 000	2000	20 000
K7	1500	30 000	1500	375 000	3000	30 000
K8	2000	40 000	2000	500 000	4000	40 000
LQC	15	300	15	1500	12	120
MQC	750	15 000	750	187 500	1500	15 000
HQC	1750	35 000	1750	437 500	3500	35 000
Dil	3500	70 000	3500	875 000	7000	70 000

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

Для хроматографического разделения использовались 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). Подвижная фаза состояла из

0,2%-го раствора муравьиной кислоты (eluent additive for LC-MS, Scharlab, Китай) в воде и ацетонитрила (Optima™ LC/MS Grade, Fisher Chemicals, Бельгия). Для элюирования применялась градиентная программа, предназначенная для анализа R004, M1 и M2 в плазме крыс и кроликов [3]. Масс-спектрометрическое детектирование также проводили в режиме MRM (полярность – положительная) (таблица 2). Для понижения чувствительности определения R004 в фекалиях и M1 в моче регулировалась энергия соударения (CE) (таблица 2)

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования

Table 2. Parameters of mass spectrometric detection

Вещества Compounds	SRM-переход SRM-transition				Тип SRM-перехода Type of SRM-transition
	Q1	Q3	CE, eV CE, eV		
			Моча Urine	Фекалии Feces	
R004	445	425	30	50	Количественный Quantitative
	445	200	40	85	Контрольный Control
M1	272	200	47	25	Количественный Quantitative
	272	144	50	40	Контрольный Control
M2	192	108	35	35	Количественный Quantitative
	192	123	25	25	Контрольный Control
R002	375	226	30	30	BC для R004 IS for R004
4CA	128	93	30	30	BC для M1 и M2 IS for M1 and M2

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.

Валидация биоаналитической методики

Валидация биоаналитических методик определения аналитов в моче и фекалиях крыс осуществлялась в полном объеме согласно требованиям Решения Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85 (приложе-

ние б) для хроматографических методов¹. Дополнительно изучалась воспроизводимость при повторном введении аналитической серии².

Дизайн исследования экскреции

Изучение экскреции R004 выполнено на 2 группах крыс линии Wistar по 6 особей. В каждую группу входило по 3 самца и 3 самки. Первой группе животных массой 260 ± 4 г (*M + m*) субстанция вводилась перорально. Второй группе крыс массой 244 ± 2 г (*M + m*) проводилась внутрибрюшинная инъекция изучаемого ЛС. Дозировка для обоих способов введения составила 10 мг/кг. Отбор проб экскретов осуществляли с помощью метаболических клеток в следующие временные промежутки:

- Образцы мочи: до введения препарата и в промежутки 0–4, 4–8, 8–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120 ч после введения.
- Образцы кала: до введения препарата и в промежутки 0–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–1120 ч.

К пробам мочи сразу после окончания периода отбора добавлялся 250 мМ раствор ацетата аммония (pH = 4,0), фекалии гомогенизировались с ацетонитрилом в соотношении 1:3 (масса:объем). Образцы хранили в морозильной камере при температуре не выше -70 °C.

Статистические расчеты

Статистическая обработка данных проводилась с применением программного обеспечения StatSoft STATISTICA 10.0.1011 и Microsoft Excel 2016. Результаты в таблицах и тексте представлены в виде среднего арифметического со стандартной ошибкой среднего ($M \pm m$).

При расчете кумулятивной экскреции (M_e) и суммарной доли элиминированного действующего вещества и метаболитов выполнялся пересчет массы M1 и M2 на массу R004. При этом учитывалась доля продуктов гидролиза в исходной молекуле. Для M1 она составила 254 Да ($C_{11}H_{13}ClN_3O_2$), для M2 – 190 Да ($C_8H_7F_3NO$). Для расчетов использовали формулы:

$$m(R004)_{M1} = n(M1) \cdot 254 \text{ мкг/мкмоль},$$

$$m(R004)_{M2} = n(M2) \cdot 190 \text{ мкг/мкмоль},$$

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

где $m(R004)_{M1/M2}$ – масса R004, элиминированная в виде M1/M2 (мкг); $n(M1/M2)$ – количество вещества M1/M2, экскретировавшегося с мочой или калом (мкмоль).

При расчете скорости экскреции (V_E) пересчет не проводился:

$$V_E = m(A)/T,$$

где $m(A)$ – масса аналита, экскретированная в период отбора (мкг); T – продолжительность периода отбора (ч).

Для проверки достоверности полученных результатов у каждого животного рассчитывалось соотношение суммарного количества вещества M1 ($n(M1)$) и M2 ($n(M2)$) по формуле:

$$R(M) = \frac{n(M1)_{urine} + n(M1)_{feces}}{n(M2)_{urine} + n(M2)_{feces}} \cdot 100\%,$$

где $R(M)$ – соотношение количества вещества метаболитов; $n(M1/M2)_{urine}$ – количество вещества M1/M2, элиминировавшегося с мочой; $n(M1/M2)_{feces}$ – количество вещества M1/M2, элиминировавшегося с фекалиями.

Среднее значение данного соотношения должно лежать в диапазоне 85–115 %. Это соответствует максимальной величине относительной погрешности (δ) ± 15 %, допустимой при оценке правильности биоаналитической методики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе валидации биоаналитических методик для определения R004, M1 и M2 в моче и фекалиях были подтверждены их селективность, линейность градуировочной зависимости, правильность и прецизионность, отсутствие влияния разведения пробы холостым образцом и матричных эффектов на их метрологические характеристики (таблица 3). Так, площади пиков R004, M1 и M2 в холостых пробах не превышали 20 % от площади пиков аналитов в пробах с концентрацией на уровне нижнего предела количественного определения (LLOQ), а площади пиков BC не превышали 5 % от площади пиков LLOQ-проб. Величина относительной погрешности при внутрисерийных и межсерийных испытаниях находилась в допустимом диапазоне ± 15 % (± 20 % для LLOQ-образцов), а величина относительного стандартного отклонения (RSD) была менее 15 % (20 % для LLOQ-образцов)^{1,2}. Перенос R004 в холостые образцы мочи не

превышал 12,51 % от площади пика образцов LLOQ, R002 – 0,16 %, а перенос M1 и M2 не наблюдался. При анализе фекалий перенос аналитов отсутствовал.

Доказана стабильность R004, M1 и M2 в течение 24 ч хранения при комнатной температуре (STS), 3 циклов замораживания/размораживания (FTS), 28 дней хранения в морозильной камере при температуре не выше -70 °C (LTS) в пробах мочи и фекалий (таблица 4). Также была подтверждена стабильность приготовленных образцов экскретов в автосемплере хроматографа в течение 48 ч (ASS) (таблица 4) и воспроизводимость результатов при повторном введении серии спустя 48 ч (см. таблицу 3).

После успешной валидации было проведено фармакокинетическое исследование на крысах (таблица 5). Установлено, что большая часть лекарственного средства выводится в неизменном виде с калом в первые 48 ч (см. рисунок 2). Доля экскреции в виде R004 при введении внутривентриально составляет $57,63 \pm 0,66$ %, а при введении перорально достигает $94,83 \pm 0,78$ % ($M \pm m$) (таблица 5). Такое различие вызвано тем, что при пероральном приеме биодоступность меньше, чем при внутривентриальной инъекции. Поэтому меньшее количество действующего вещества проникает в системный кровоток и подвергается ферментативному гидролизу. В пробах мочи R004 не обнаружен.

M1 выводится преимущественно через почки (таблица 5). Большая часть кумулятивной экскреции данного метаболита достигается в промежуток 4–12 ч после введения (рисунок 3). Самая высокая скорость ренальной экскреции наблюдается в первые 4 ч эксперимента при обоих способах (см. рисунок 2). После 48 ч концентрация M1 в большинстве проб мочи крыс ниже LLOQ методики.

Метаболит M2, как и действующее вещество, выводится преимущественно с калом. В моче обнаружены следовые количества M2: его доля составляет 0,01–0,02 % от общего количества R004 (таблица 5). После перорального введения у большинства животных M2 начинает экскретироваться спустя 24 ч, после внутривентриальной инъекции – спустя 12 ч. Основная часть M_E данного соединения достигается в течение 24–48 ч (см. рисунок 2). Наибольшая V_E M2 наблюдается в период 12–24 ч.

Соотношение суммарного количества вещества экскретировавшихся метаболитов M1 и M2 составило $103,94 \pm 3,83$ % при пероральном и $98,24 \pm 1,16$ % при внутривентриальном введении ($M \pm m$). Это укладывается в допустимый промежуток 85,0–115,0 %, что указывает на правильность измерений и отсутствие других основных путей выведения метаболитов.

Таким образом, основная часть R004 как в неизменном виде, так и в виде метаболитов элиминировается в первые 24–48 ч при обоих способах введения (рисунок 4). Спустя 72–96 ч выводятся остаточные количества изучаемых соединений. В период 96–120 ч содержание аналитов в пробах находилось ниже LLOQ разработанных методик.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Таблица 3. Результаты валидации методики определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов в фекалиях и моче крыс

Table 3. Validation results of method of determination of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in feces and urine of rats

Параметр Parameter	Моча Urine						Фекалии Feces						
	R004		M1		M2		R004		M1		M2		
Аналитический диапазон Analytical range	5–2000 нг/мл 5–2000 ng/ml		100–40 000 нг/мл 100– 40 000 ng/ml		5–2000 нг/мл 5–2000 ng/ml		0,5–500 мкг/г 5–2000 µg/g		4–4000 нг/г 4–4000 ng/g		40–40 000 нг/г 40– 40 000 ng/g		
Селективность (% от площади пика образца LLOQ) Selectivity (% of peak area of the LLOQ sample)	R004	BC IS	M1	BC IS	M2	BC IS	R004	BC IS	M1	BC IS	M2	BC IS	
	11,52	0,12	0	0	0	0	1,24	0,14	0	0	0	0	
Правильность и прецизионность Accuracy and precision	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	
Серия 1 (n = 6*) Batch 1 (n = 6*)	LLOQ	1,10	5,72	2,47	5,10	–4,00	8,38	–1,00	6,85	3,58	6,39	5,63	3,40
	LQC	–3,61	6,93	–4,99	8,24	1,34	6,08	–0,33	5,81	3,03	5,35	3,34	7,31
	MQC	–3,85	3,94	–3,01	6,33	–2,70	1,97	–2,16	7,96	6,33	1,93	3,11	5,96
	HQC	–1,92	3,00	0,74	4,58	–2,53	4,94	–0,55	3,36	1,64	4,91	2,76	2,86
Серия 2 (n = 6*) Batch 2 (n = 6*)	LLOQ	0,90	7,19	7,73	3,99	1,03	5,49	–2,33	9,81	4,46	4,83	5,58	3,60
	LQC	0,73	5,70	2,39	8,89	0,21	4,42	–3,22	5,43	3,00	4,06	4,41	4,28
	MQC	4,66	2,99	–4,88	6,02	3,89	2,46	2,41	5,44	3,94	4,59	2,75	2,87
	HQC	2,59	3,58	–0,52	3,82	2,90	3,06	1,10	3,36	0,09	3,30	1,80	2,78
Серия 3 (n = 6*) Batch 3 (n = 6*)	LLOQ	1,10	6,34	–0,34	4,44	2,57	5,41	–3,00	9,38	5,04	3,71	6,52	2,06
	LQC	3,09	3,09	4,41	6,54	3,51	4,59	–1,33	5,04	1,79	5,97	2,33	6,48
	MQC	2,49	3,54	3,16	6,21	5,19	4,27	1,40	6,48	4,76	5,10	2,39	7,34
	HQC	1,57	4,12	2,98	2,52	3,51	4,31	0,33	2,72	1,02	3,13	2,44	3,41
Межсерийная (n = 18*) Inter-batch (n = 18*)	LLOQ	1,03	6,05	3,28	5,40	–0,13	6,75	–1,50	8,82	4,61	4,57	5,71	3,04
	LQC	0,07	5,82	0,60	8,51	1,69	4,97	–2,36	5,11	2,90	5,10	4,87	5,04
	MQC	1,10	4,92	–1,58	6,84	2,12	4,55	–0,02	7,00	5,87	3,50	2,76	5,31
	HQC	0,75	3,92	1,07	3,80	1,29	4,77	0,40	3,24	0,43	3,78	2,52	2,94
Воспроизводимость при повторном введении серии (48 ч) Reinjection reproducibility (48 ч)	LLOQ	–1,20	4,57	0,34	2,45	2,17	5,10	–1,67	9,22	0,63	8,77	4,51	2,70
	LQC	2,61	2,97	2,60	5,95	1,83	3,83	0,56	5,26	2,19	4,94	0,01	5,34
	MQC	1,94	4,17	–0,25	4,85	3,47	3,74	–1,30	8,23	5,51	3,06	1,77	3,69
	HQC	3,38	3,02	1,88	2,49	2,20	4,12	–0,05	2,64	0,89	3,12	1,39	2,99
Эффект разведения (n = 6) Dilution integrity (n = 6)	X2	0,24	5,13	–0,30	2,43	1,86	2,75	5,31	2,78	5,27	1,68	4,40	1,73
Эффект матрицы (RSD NMF, %) Matrix effect (RSD NMF, %)	LQC	6,58		5,01		2,83		8,26		3,75		6,54	
	HQC	6,18		6,61		3,17		5,67		5,51		6,19	

Примечание. * Количество проб на каждом уровне концентраций.

Note. * The number of samples at each concentration level.

Таблица 4. Результаты изучения стабильности 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов в фекалиях и моче крыс

Table 4. Results of stability study of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in feces and urine of rats

Параметр Parameter	Температурный режим Temperature condition	Уровень концентрации Concentration level	% от номинального значения % of the nominal value					
			Моча Urine			Фекалии Feces		
			R004	M1	M2	R004	M1	M2
STS (n = 6*)	Комнатная температура Room temperature	LQC	0,34	-0,64	-1,47	-0,44	2,63	2,89
		HQC	0,46	0,74	-1,36	1,44	2,25	2,68
FTS (n = 6*)	Комнатная температура / не выше -70 °C Room temperature / no higher than -70 °C	LQC	0,69	-4,94	-0,10	6,11	4,61	4,76
		HQC	0,93	1,70	-0,62	2,72	3,74	3,20
ASS (n = 6*)	Не выше -4 °C (автосемплер) Not higher than -4 °C (auto-sampler)	LQC	1,12	-2,84	-1,68	0,67	2,50	1,21
		HQC	0,82	1,46	-0,99	0,94	1,82	2,54
LTS (n = 6*)	Не выше -70 °C No higher than -70 °C	LQC	0,37	-1,99	0,19	1,11	3,42	1,78
		HQC	0,90	0,80	-0,61	-1,44	2,24	0,81

Примечание. * Количество проб на каждом уровне концентраций.

Note. * The number of samples at each concentration level.

Таблица 5. Результаты изучения экскреции 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид после перорального и внутрибрюшинного введения

Table 5. The results of excretion study of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide after oral and intraperitoneal administration

Аналит Analyte	Путь выведения Route of excretion	Путь введения Route of administration			
		Пероральный Oral		Внутрибрюшинный Intraperitoneal	
		M ± m, %	RSD, %	M ± m, %	RSD, %
R004	Моча Urine	0	-	0	-
	Фекалии Feces	94,83 ± 0,78	2,00	57,63 ± 0,66	2,79
	Суммарно, моча и кал Total, urine and feces	94,83 ± 0,78	2,00	57,63 ± 0,66	2,79
M1	Моча Urine	2,73 ± 0,46	41,27	23,82 ± 0,30	3,05
	Кал Feces	0,28 ± 0,08	73,23	0,22 ± 0,04	43,30
	Суммарно, моча и кал Total, urine and feces	3,01 ± 0,46	37,80	24,04 ± 0,30	3,03
M2	Моча Urine	0,01 ± 0,00	72,38	0,02 ± 0,00	27,22
	Кал Feces	2,16 ± 0,31	35,67	18,31 ± 0,38	5,09
	Суммарно, моча и кал Total, urine and feces	2,16 ± 0,32	35,76	18,33 ± 0,38	5,10
Метаболиты, суммарно Metabolites, total	Суммарно, моча и кал Total, urine and feces	5,17 ± 0,78	36,69	42,37 ± 0,66	3,80
	n(M1)/n(M2)	103,94 ± 3,83	9,02	98,24 ± 1,16	2,90

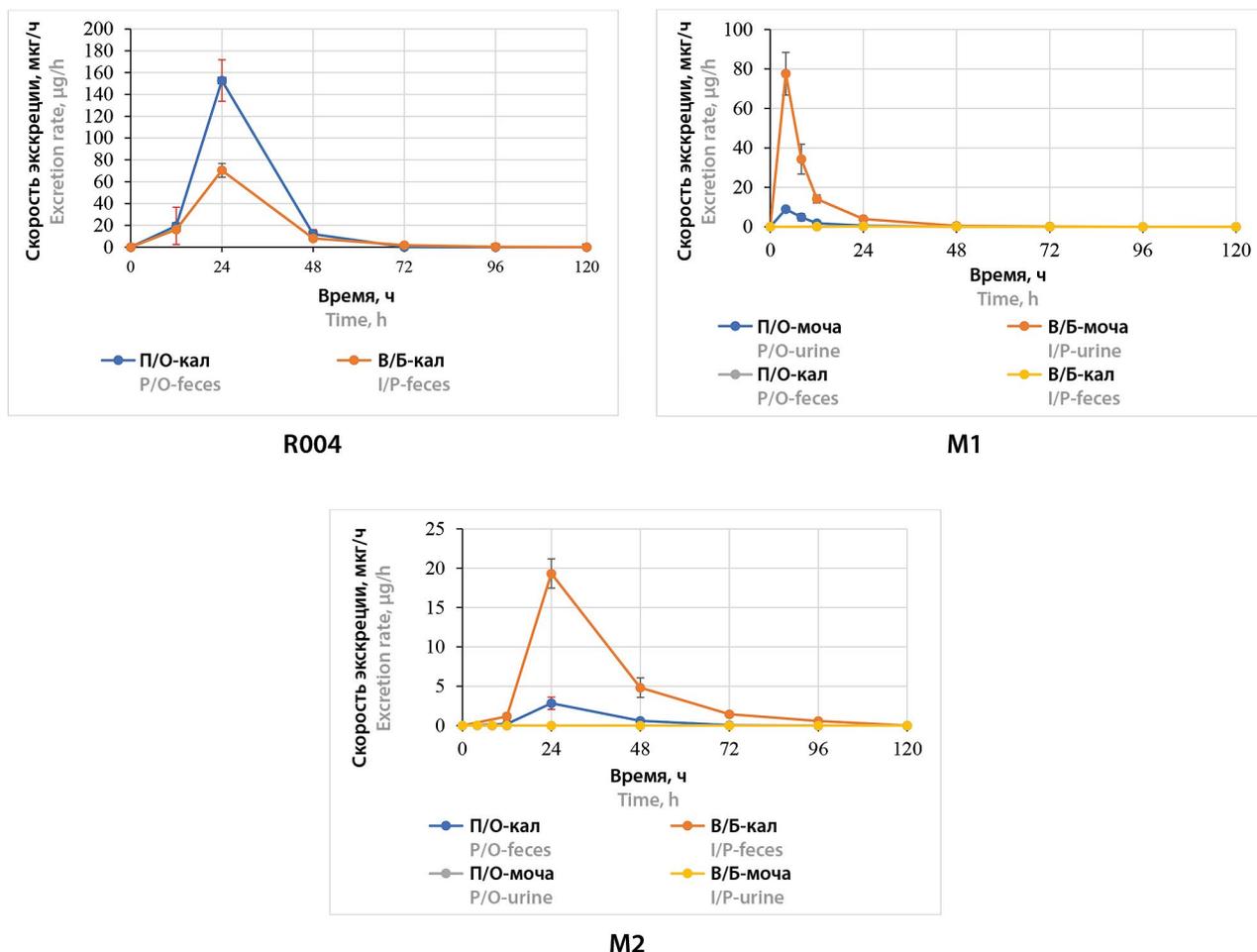


Рисунок 3. Скорость экскреции (со стандартной ошибкой среднего) 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов после перорального и внутрибрюшинного введения субстанции.

Примечание. П/О – пероральное введение; В/Б – внутрибрюшинное введение

Figure 3. Rate of excretion (with standard error of mean) of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites after oral and intraperitoneal administration of the substance.

Note. P/O – oral administration; I/P – intraperitoneal administration

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоаналитические методики количественного определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты и 4-метокси-3-(трифторметил)анилина в моче и фекалиях были успешно валидированы. Установлено, что большая часть лекарственного препарата в неизменном виде, а также в виде М2 экскретируется с калом. Метаболит М1 выводится преимущественно ренальным путем. Основная часть кумулятивной экскреции изучаемых соединений достигается через 48 ч после

введения. Полная элиминация R004 наступает спустя 96 ч эксперимента. Более низкая доля выведения R004 в виде метаболитов при пероральном введении субстанции вызвана меньшей биодоступностью по сравнению с внутрибрюшинной инъекцией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Korsakov M.K., Fedorov V.N., Smirnov N.A., Shetnev A.A., Leonova O.V., Volkhin N.N., Andreyev A.I. Screening of anti-inflammatory activity of 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide (PAR-2 inhibitors) based on formaldehyde oedema model among white lab rats. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(4):105–111. DOI: 10.18413/rrpharmacology.9.10061.

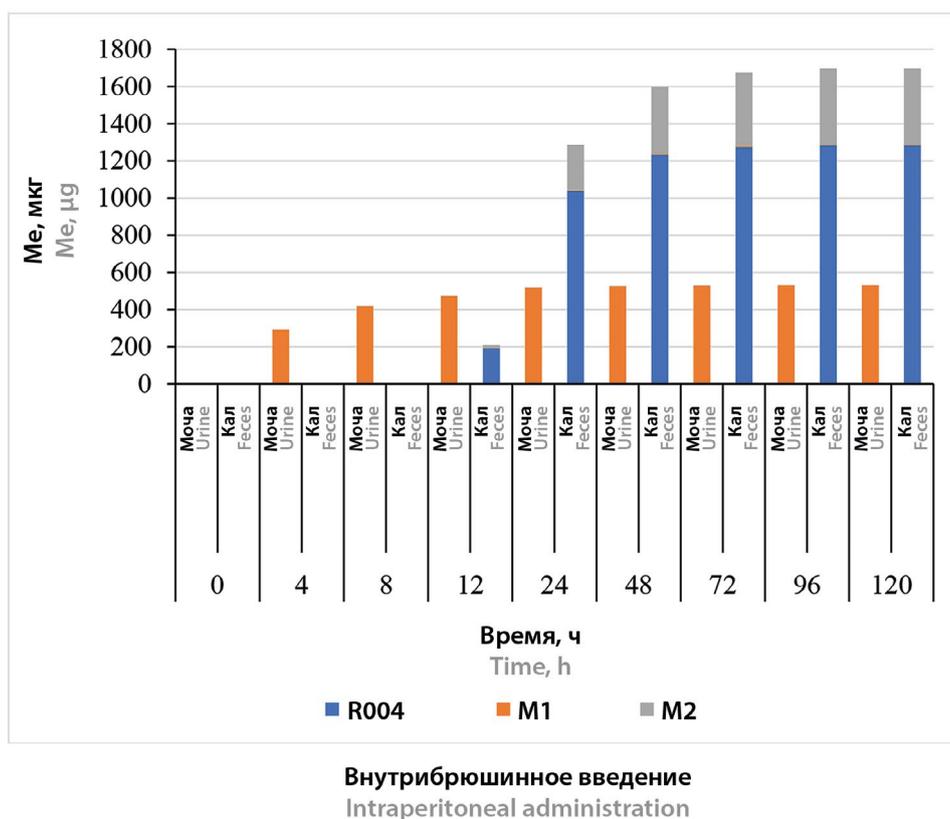
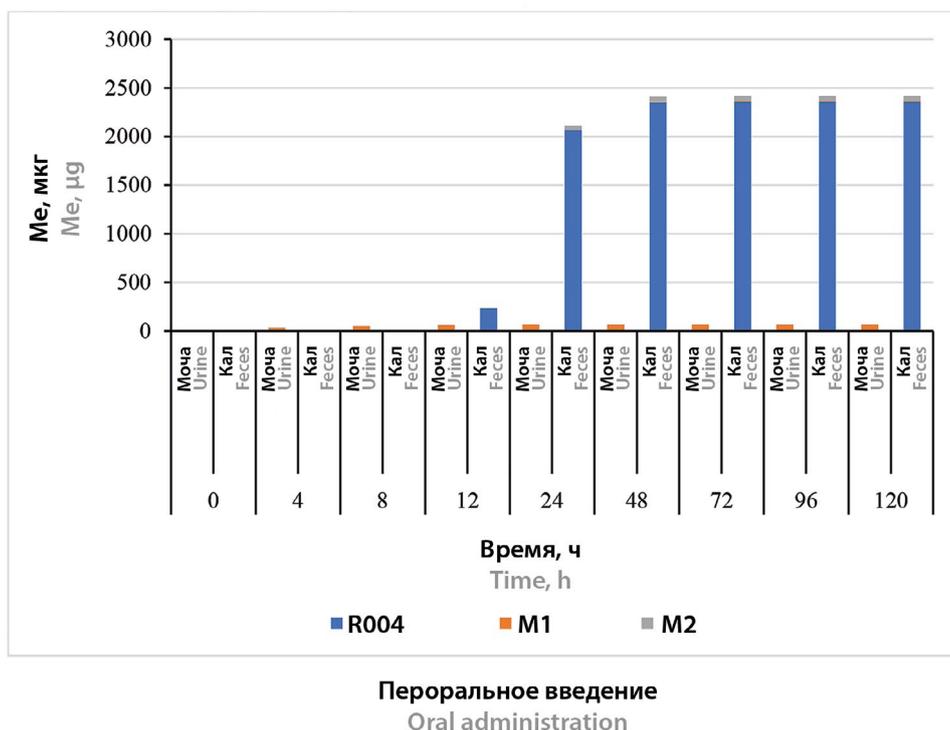


Рисунок 4. Кумулятивная экскреция 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды после перорального (П/О) и внутрибрюшинного (В/Б) введения субстанции

Figure 4. Cumulative excretion 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide after oral (П/О) and intraperitoneal (В/Б) administration of the substance

2. Khokhlov A. L., Yaichkov I. I., Alexeev M. A., Korsakov M. K., Shetnev A. A., Ivanovskiy S. A., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Vasilyeva E. A. Identification and synthesis of metabolites of the new 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide derivative. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(2):83–95. DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.482.
3. Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Tyushina A. N., Zaykova V. E., Lasaraynz O. E. Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats. *Drug development & registration*. 2024;13(4):238–250. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876.
4. Letertre M. P. M., Munjoma N., Wolfer K., Pechlivanis A., McDonald J. A. K., Hardwick R. N., Cherrington N. J., Coen M., Nicholson J. K., Hoyles L., Swann J. R., Wilson I. D. A Two-Way Interaction between Methotrexate and the Gut Microbiota of Male Sprague–Dawley Rats. *Journal of Proteome Research*. 2020;19(8):3326–3339. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00230.
5. Šturm S., Škibin A., Pogačnik M., Cerkvenik-Flajs V. Determination of free and total bisphenol A in the urine and feces of orally and subcutaneously dosed sheep by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2020;55(7):655–668. DOI: 10.1080/03601234.2020.1759329.
6. Ma C., Li D., Dang R., Gu Y., Li A., Zhao Y., Qi F., Liu J. Metabolism, pharmacokinetics, and bioavailability of yuanhuacine in rat using LC-MS. *Biomedical Chromatography*. 2023;37(2):e5540. DOI: 10.1002/bmc.5540.
7. Qiu J., Zhu M., Wang Y., Chen B., Bai R., Chen F., Li Y., Zhou Y., Zhang L. Pharmacokinetic and excretion study of eight active constituents in rat by LC-MS/MS after oral administration of the *Toddalia asiatica* extract. *Analytical Biochemistry*. 2022;640:114407. DOI: 10.1016/j.ab.2021.114407.
8. Song C. H., Kim K., Kang E., Jeong B., Lee M.-S., Jung J., Kim T. H., Shin S., Shin B. S. Determination of pharmacokinetics and tissue distribution of a novel lutetium-labeled PSMA-targeted ligand, ¹⁷⁷Lu-DOTA-PSMA-GUL, in rats by using LC–MS/MS. *Scientific Reports*. 2022;12(1):15452. DOI: 10.1038/s41598-022-19700-9.