

Изучение распределения нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида на крысах

И. И. Яичков^{1,2✉}, М. К. Корсаков², Н. Н. Вольхин¹, С. С. Петухов^{1,2}, А. Н. Тюшина^{1,2},
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, Ярославская область, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского» (ЯГПУ им. К. Д. Ушинского). Центр трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова. 150010, Россия, Ярославская область, г. Ярославль, ул. Технопарковая, д. 11/2

✉ Контактное лицо: Яичков Илья Игоревич. E-mail: i.yaichkov@yspu.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>;

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

А. Н. Тюшина – <https://orcid.org/0009-0007-8084-5239>;

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

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

Статья поступила: 20.07.2025

Статья принята в печать: 06.11.2025

Статья опубликована: 07.11.2025

Резюме

Введение. Новое фармакологически активное вещество 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида (R004) является новым ингибитором PAR-2-рецепторов для терапии ревматоидного артрита. Данное соединение находится на этапе доклинического исследования. Изучение распределения R004 и его метаболитов по органам и тканям ранее не проводилось.

Цель. Изучение распределения R004 и его метаболитов по органам и тканям крыс после однократного перорального введения субстанции.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 50 крысах-самцах линии Wistar. Субстанция R004 вводилась перорально в терапевтической дозировке 10 мг/кг. Отбор образцов печени, почек, сердца, легких, селезенки, мозга, кожи и мышц проводился через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 ч после введения лекарственного средства. Органы немедленно гомогенизировались с использованием ацетонитрила и замораживались. Дальнейшую пробоподготовку осуществляли путем добавления к гомогенатам ацетонитрильного раствора внутренних стандартов. Количественное определение R004 и его 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) проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты и обсуждение. Биоаналитическая методика количественного определения R004, M1 и M2 в органах и тканях была успешно валидирована в аналитических диапазонах 2–2000 нг/г для R004 и 1–1000 нг/г для M1 и M2. R004 распределяется по всем изучаемым биологическим объектам. Тканевая биодоступность R004 уменьшается в следующей последовательности: печень > кожа > почки > легкие > мышцы > сердце > селезенка > мозг. M1 и M2 в больших количествах обнаружены в печени и почках. В сердце, легких и селезенку метаболиты проникали в значительно меньших концентрациях. В тканях кожи идентифицирован только M2. В мозге и мышцах M1 и M2 не обнаружены.

Заключение. Валидированная биоаналитическая методика была успешно использована при изучении распределения субстанции R004. Действующее вещество хорошо распределяется по всем изучаемым органам и имеет высокую тканевую биодоступность. Наибольшие концентрации метаболитов зафиксированы в печени и почках.

Ключевые слова: ингибитор PAR-2-рецепторов, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика, распределение, гомогенизация

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. А. А. Шетнев отвечал за формулирование целей и задач, организационную часть исследования. Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов, А. Н. Тюшина, В. Е. Зайкова, О. Э. Лазарянц отвечали за работу с лабораторными животными

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

Для цитирования: Яичков И. И., Корсаков М. К., Вольхин Н. Н., Петухов С. С., Тюшина А. Н., Зайкова В. Е., Лазарянц О. Э. Изучение распределения нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамиды на крысах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-1879>

The study of distribution of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats

Ilya I. Yaichkov^{1,2}✉, Mikhail K. Korsakov², Nikita N. Volkhin¹, Sergey S. Petukhov^{1,2},
Alena N. Tyushina^{1,2}, Valeria E. Zaykova^{1,2}, Olga E. Lasaraynz^{1,2}

¹ Yaroslavl State Medical University. 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, Yaroslavl region, 150000, Russia

² Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky. M. V. Dorogov Center for Transfer of Pharmaceutical Technologies. 11/2, Tekhnoparkovaya str., Yaroslavl, Yaroslavl region, 150010, 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>;
Sergey S. Petukhov – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>;
Alena N. Tyushina – <https://orcid.org/0009-0007-8084-5239>;
Valeria E. Zaykova – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;
Olga E. Lasaraynz – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Received: 20.07.2025

Accepted: 06.11.2025

Published: 07.11.2025

Abstract

Introduction. The new pharmacologically active substance 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 a new PAR-2 receptor inhibitor for treatment of rheumatoid arthritis. This compound is at the stage of preclinical trial. The distribution study of R004 and its metabolites by organs and tissues has not been performed before.

Aim. The investigation of distribution of R004 and its metabolites in rat organs after a single oral administration of the active substance.

Materials and methods. The study was carried out on 50 male Wistar rats. Substance of R004 was administered orally at a therapeutic dosage of 10 mg/kg. Sampling of liver, kidneys, heart, lungs, spleen, brain, skin and muscles was performed 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h after administration of the drug. Organs were immediately homogenized using acetonitrile and frozen. Further sample preparation was carried out by addition an acetonitrile solution of internal standards to the homogenates. Quantification of R004 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) was performed by HPLC-MS/MS.

Results and discussion. The developed method for quantification of R004, M1 and M2 in organs has been successfully validated in the analytical ranges of 2–2000 ng/g for R004 and 1–1000 ng/g for M1 and M2. R004 is distributed by all studied biological objects. The tissue bioavailability of R004 decreases in the following sequence: liver > skin > kidneys > lungs > muscles > heart > spleen > brain. M1 and M2 was detected in large quantities in liver and kidneys. Metabolites penetrated into the heart, lungs and spleen in much lower concentrations. In skin tissues only M2 was identified. M1 and M2 were not found in brain and muscles.

Conclusions. The validated bioanalytical method has been successfully used for distribution study of R004 substance. The drug is well distributed throughout the studied organs and has a high tissue bioavailability. The highest concentrations of metabolites were observed in liver and kidneys.

Keywords: PAR-2 receptor inhibitor, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics, distribution, homogenization

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, Sergey S. Petukhov, Alena N. Tyushina, Valeria E. Zaykova, Olga E. Lasaraynz carried out the experiment on laboratory animals.

Funding. Grant of Russian Scientific Fund № 22-13-20085.

For citation: Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Tyushina A. N., Zaykova V. E., Lasaraynz O. E. The study of distribution of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats. *Drug development & registration*. 2025;14(4). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-1879>

ВВЕДЕНИЕ

Производное 4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид, 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-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, в ходе которого доказана его фармакологическая активность. Данное соединение является новой перспективной молекулой для терапии ревматоидного артрита [1]. R004 подвергается биотрансформации путем гидролиза с образованием двух основных метаболитов: 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1) и 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (M2) (рисунок 1) [2]. При изучении системной экспозиции субстанции R004 на крысах установлена линейность фармакокинетических параметров максимальной концентрации и площади под фармакокинетической кривой «концентрация – время» у действующего вещества и его метаболитов в диапазоне доз от 10 до 40 мг/кг [3].

Изучение распределения R004 и его метаболитов ранее не проводилось. Наиболее часто для данных исследований используют грызунов – крыс [4–7]. Методика для количественного определения R004, M1 и M2 в органах животных ранее не разрабатывалась. При ее создании могут быть адаптированы парамет-

ры ВЭЖХ-МС/МС-анализа, использованные в биоаналитической методике для плазмы [3]. Для подготовки проб тканей возможно применение механической гомогенизации [4, 8, 10, 11], ультразвуковой гомогенизации [5, 6, 9], а также ферментативной обработки [10]. Однако ввиду нестабильности R004 в пробах после отбора [2, 3] использование последних двух способов нецелесообразно из-за их длительности. Кроме того, при ферментативном разложении гидролиз действующего вещества может усилиться. Для извлечения аналитов целесообразно использовать органические растворители. Так, применение органического экстрагента метанола в смеси с водой в объемном соотношении 9:1 предотвратило гидролиз симвастатина в гомогенатах тканей [12].

Таким образом, **целью работы** является изучение распределения R004 и его метаболитов по органам и тканям крыс после однократного перорального введения субстанции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аналитическое оборудование и реактивы

Для количественного определения R004 и его метаболитов применялись высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent

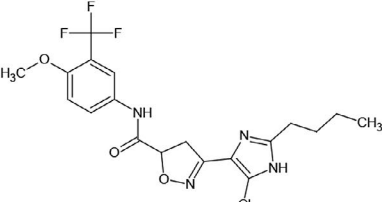
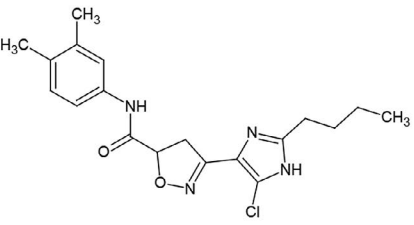
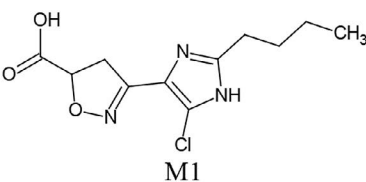
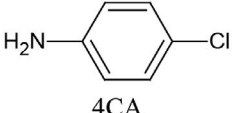
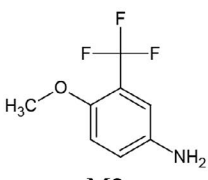
Аналиты Analytes	Внутренние стандарты Internal standards
 R004	 R002
 M1	 4CA
 M2	

Рисунок 1. Структурные формулы 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004), его метаболитов (M1 и M2) и внутренних стандартов (R002 и 4CA)

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 (R004), its metabolites (M1 and M2) and internal standards (R002 and 4CA)

Technologies, Германия), совмещенный с tandemным масс-спектрометрическим детектором QTRAP 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур). Программное обеспечение Analyst 1.6.2 (AB Sciex LLC, США) использовалось для управления ВЭЖХ-МС/МС-системой, а пакет MultiQuant 3.0.5 (AB Sciex LLC, США) – для обработки полученных хроматограмм.

В качестве стандартных образцов изучаемых соединений применялись 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (99,2 %), 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновая кислота (99,3 %) (оба – Центр трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, Россия); 4-метокси-3-(трифторметил)анилин (99,0 %, Alfa Aesar, США). Для приготовления раствора внутренних стандартов (ВС) использовались 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[3,4-диметилфенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R002) (98,5 %, Центр трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, Россия) и 4-хлоранилин (4CA) (≥ 98 %, Alpha Chemika, Индия), а также ацетонитрил (о.с.ч., АО «Химмед», Россия).

Подготовка проб органов

Органы после отбора немедленно охлаждали жидким азотом, затем взвешивали, добавляли ацетонитрил в соотношении 1:1 (масса/об.) и гомогенизировали на шариковом гомогенизаторе (Homogenizer Bioprep-6, Allsheng, Китай) с применением шариков из нержавеющей стали диаметром 5 мм. Затем пробы центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, США) и охлаждении до +4 °C и к 50 мкл надосадочной жидкости добавляли 100 мкл раствора ВС R002 и 4CA в ацетонитриле. Смесь перемешивали на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и температуре +4 °C, супернатант переносили в микровставки для виал. Для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества 10 мкл рабочего раствора R004, M1 и M2 в диметилсульфоксиде (х.ч., АО «ЭКОС-1», Россия) добавляли к 190 мкл гомогената. Концентрация аналитов в пробах составляла:

- R004: калибровочные образцы – 2 (нижний предел количественного определения – LLOQ), 10, 50, 200, 500, 1000, 1500, 2000 нг/мл; образцы контроля качества – 6 (нижний уровень – LQC), 750 (средний уровень – MQC), 1750 нг/мл (верхний уровень – HQC), образцы для оценки эффекта разведения – 3500 нг/мл (Dil);
- M1 и M2: калибровочные образцы – 1 (LLOQ), 5, 25, 100, 250, 500, 750, 1000 нг/мл; образцы контроля качества – 3 (LQC), 375 (MQC), 875 (HQC) нг/мл, образцы для оценки эффекта разведения – 1750 нг/мл (Dil).

Параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

Хромато-масс-спектрометрическое определение проводили с помощью методики, использованной для определения изучаемых соединений в плазме [3]. Для хроматографического разделения применяли хроматографическую колонку 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) и подвижную фазу (ПФ), состоящую из 2 элюентов: 0,2%-го раствора муравьиной кислоты («eluent additive for LC-MS», Scharlab, Китай) в воде (компонент А) и ацетонитрила (компонент Б). Элюирование осуществляли в градиентном режиме [3]. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин, температура термостата – 40 °C. В стартовый состав ПФ входило 60 % компонента А и 40 % компонента Б. С 0,5 мин по 3 мин анализа содержание водной части ПФ линейно снижалось до 10 %, а органической части – увеличивалось до 90 %. Данное соотношение элюентов сохранялось до 8,5 мин анализа. Затем состав ПФ восстанавливался до начальных значений в течение 0,1 мин. Время уравнивания системы составляло 4 мин.

Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось с применением электрораспылительной ионизации (полярность – положительная). Для определения аналитов и ВС использовались следующие MRM-переходы:

- R004 – 445 → 425 m/z (количественный) и 445 → 200 m/z (контрольный);
- M1 – 272 → 200 m/z (количественный) и 272 → 144 m/z (контрольный);
- M2 – 192 → 108 m/z (количественный) и 192 → 123 m/z (контрольный);
- R002 (ВС для R004) – 375 → 226 m/z;
- 4CA – 128 → 93 m/z (для расчетов M1) и 128 → 75 m/z (для расчетов M2).

Валидация биоаналитической методики

Валидация методики осуществлялась согласно требованиям решения Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85¹ и руководства ICH M10². Объем валидационных испытаний внутрисерийной прецизионности и правильности, эффекта разведения, стабильности, воспроизводимости при повторном введении серии был оптимизирован для минимизации использования холостых образцов органов животных (таблица 1).

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 20.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 20.07.2024.

Таблица 1. Результаты изучения линейности методики определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в органах крысы

Table 1. The results of studying the linearity of the method of quantification 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 rat organs

Испытание Test	R004		M1		M2	
Аналитический диапазон, нг/г Analytical range, ng/g	2–2000		1–1000		1–1000	
Калибровочная зависимость Calibration dependence	Линейная Linear		Линейная Linear		Линейная Linear	
Весовой коэффициент Weighting	1/x		1/x		1/x	
Органы крысы Rat organs	a	b	a	b	a	b
Печень (6 серий) Liver (6 batches)	0,00040	0,00013	0,00374	0,00111	0,00556	0,00224
Почки (3 серии) Kidneys (3 batches)	0,00041	0,00025	0,00396	0,00051	0,00523	0,00107
Сердце (3 серии) Heart (3 batches)	0,00040	0,00017	0,00408	0,00063	0,00522	0,00075
Легкие (3 серии) Lung (3 batches)	0,00037	0,00026	0,00387	0,00100	0,00551	0,00126
Селезенка (3 серии) Spleen (3 batches)	0,00037	0,00024	0,00381	0,00094	0,00544	0,00202
Мозг (3 серии) Brain (3 batches)	0,00037	0,00012	0,00398	0,00105	0,00549	0,00217
Кожа (3 серии) Skin (3 batches)	0,00039	0,00026	0,00422	0,00116	0,00508	0,00266
Мышцы (3 серии) Muscles (3 batches)	0,00039	0,00037	0,00424	0,00101	0,00529	0,00171

Примечание. а – средние значения угловых коэффициентов калибровочных кривых; b – средние значения свободных коэффициентов калибровочных кривых.

Note. a – mean values of slopes of calibration curves; b – mean values of intercepts of calibration curves.

Дизайн исследования распределения

Распределение R004 изучалось на 50 крысах-самцах линии Wistar (питомник ООО «СМК Стезар») массой 255 ± 2 г. Субстанция лекарственного средства вводилась перорально в дозировке 10 мг/кг. Отбор образцов органов проводился через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 ч после введения лекарственного средства. На каждую точку использовалось по 5 крыс. Животных умерщвляли декапитацией. Печень, почки, сердце, легкие, селезенку, мозг, пробы кожи и мышц бедра немедленно извлекали, обрабатывали жидким азотом, взвешивали и гомогенизировали с ацетонитрилом. Полученные гомогенаты хранили в морозильной камере при температуре не выше –70 °С.

Исследование было одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К. Д. Ушинского (протокол № 1 от 29.01.2024).

Расчет фармакокинетических параметров

Для каждого органа рассчитывались следующие фармакокинетические параметры: R004, M1 и M2 с помощью программного пакета R v.3.3.2, (модуль Bear v. 2.7.7): максимальная концентрация (C_{max}); время достижения максимальной концентрации (T_{max}); площадь под кривой «концентрация – время» от момента введения до последней точки отбора (AUC_{0-t}) и до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$); среднее резидентное время (MRT). Тканевая биодоступность (F_t) рассчитывалась с помощью Microsoft Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе разработки методики была изучена стабильность R004 в ацетонитрильных гомогенатах органов. Испытание проводилось на образцах с кон-

центрацией изучаемого вещества HQC. Для расчетов использовался метод внешнего стандарта. Так, исследуемое соединение оставалось стабильным в течение 24 ч хранения проб гомогенатов при комнатной температуре (STS), 3 циклов заморозки/разморозки проб гомогенатов (FTS), а также 24 ч хранения приготовленных проб в автосемплере (ASS) (рисунок 2).

Для оценки степени извлечения (СИ) рабочий раствор аналитов добавлялся к кусочкам цельных органов, затем проводилась их гомогенизация, пробоподготовка и количественное определение. Так, СИ R004 находилась в диапазоне 89,16–94,13 %, СИ метаболита M1 – 89,15–94,03 %, СИ метаболита M2 – 88,67–92,61 %. Данные результаты являются приемлемыми для дальнейшей валидации методики и свидетельствуют об отсутствии гидролиза R004 в процессе механической гомогенизации. Обратной конверсии метаболитов в исходную молекулу в процессе хранения и гомогенизации не наблюдалось.

Оценка селективности проводилась на пробах каждого изучаемого объекта, полученных от 6 разных крыс. Правильность и прецизионность определения аналитов на уровне концентраций LLOQ при этом соответствовала установленным требованиям (таблица 3). На хроматограммах холостых образцов обнаружены только хроматографические пики в области времени удерживания R004: их площадь не превышала 10,23 % от площади пиков LLOQ-образца. Аналитический сигнал других изучаемых веществ и внутренних стандартов отсутствовал в интактных пробах.

Линейность калибровочных кривых была подтверждена в диапазоне 2–2000 нг/г для R004 и в диапазоне 1–1000 нг/г для метаболитов M1 и M2 (см. таблицу 1). При этом 6 аналитических серий были выполнены на образцах печени, так как на ней проводился весь объем валидационных испытаний. На пробах других органов и тканей проанализированы по 3 валидационные серии. Средние значения угловых коэффициентов градуировочных кривых, построенных на гомогенатах разных биологических объектов, были близки (см. таблицу 1).

Изучение эффекта матрицы было выполнено на гомогенатах каждого исследуемого органа и ткани, полученных от 6 разных животных: анализировались по 6 проб на уровнях концентрации LQC и HQC. Величина относительного стандартного отклонения нормализованного фактора матрицы (NMF) R004, M1 и M2 в каждой матрице не превышала 15 % (таблица 2). Абсолютные значения NMF у всех аналитов в пробах разных органов были близкими и отличались менее чем на 15 %. Ввиду отсутствия различий в результатах оценки селективности, градуировочной зависимости и эффекта матрицы, проведенных на образцах печени, почек, сердца, легких, селезенки, мозга, кожи и мышц крысы, объем валидационных испытаний был сокращен. Поэтому подтверждение воспроизводимости при повторном введении, краткосрочной стабильности, стабильности после 3-кратной заморозки/разморозки, стабильности в автосемплере, отсутствия эффекта разведения проводились только на гомогенатах печени.

Таблица 2. Оценка эффекта матрицы 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 органах крысы

Table 2. Evaluation of matrix effect of the 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 rat organs

Орган Organ	Показатель Parameter	R004		M1		M2	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Печень Liver	NMF	0,990	0,954	0,977	0,969	0,957	0,961
	RSD (NMF), %	1,82	7,92	3,55	2,05	3,22	4,32
Почки Kidneys	NMF	0,958	0,970	0,979	0,990	0,971	0,939
	RSD (NMF), %	3,78	8,15	6,16	4,32	2,35	3,87
Сердце Heart	NMF	0,984	0,950	0,944	0,960	0,949	0,953
	RSD (NMF), %	5,91	3,06	6,03	3,99	5,57	3,23
Легкие Lung	NMF	0,961	0,977	0,984	0,979	0,959	0,958
	RSD (NMF), %	4,54	2,69	2,95	1,75	5,46	4,56
Селезенка Spleen	NMF	0,990	0,946	0,949	0,962	0,990	0,979
	RSD (NMF), %	5,46	4,74	7,06	6,44	1,94	3,47
Мозг Brain	NMF	0,984	0,957	0,986	0,967	0,939	0,973
	RSD (NMF), %	4,24	5,64	2,42	2,45	6,06	3,49
Кожа Skin	NMF	0,960	0,982	0,979	0,984	0,959	0,941
	RSD (NMF), %	4,92	2,27	3,78	3,05	3,12	4,03
Мышцы Muscles	NMF	0,987	0,978	0,984	0,936	0,987	0,971
	RSD (NMF), %	6,46	3,54	4,86	5,77	4,47	3,36

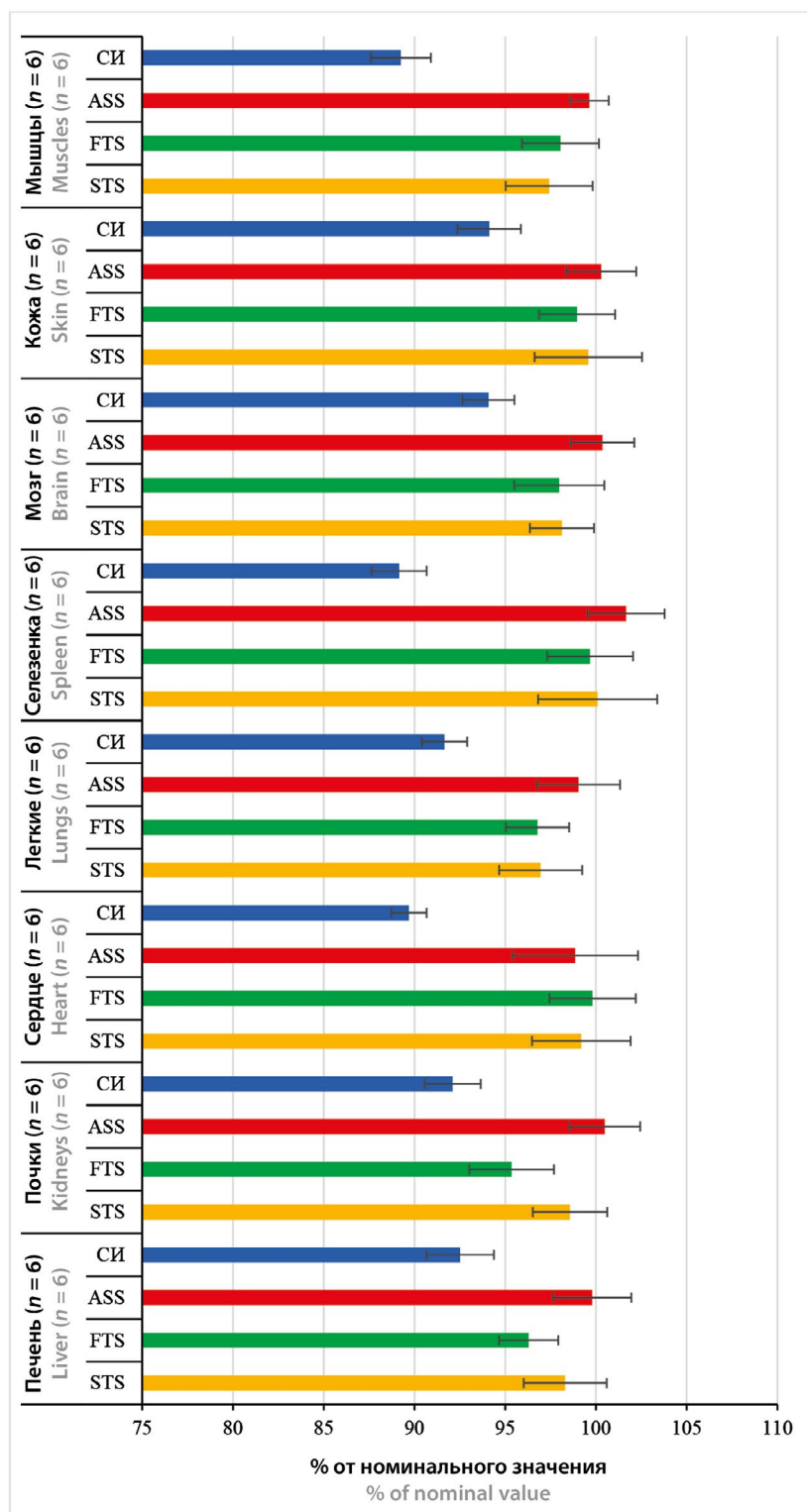


Рисунок 2. Результаты предварительных испытаний стабильности 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид в гомогенатах органов (со стандартной ошибкой среднего).

STS – краткосрочная стабильность; ASS – стабильность в автосемплере; FTS – стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки; CI – степень извлечения

Figure 2. Results of preliminary stability tests of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide in organ homogenates (with the standard error of the mean).

STS – short-term stability; ASS – autosampler stability; FTS – stability after 3 cycles of freezing/thawing; CI – recovery

Для подтверждения внутрисерийной правильности и прецизионности методики анализировались по 2 валидационные серии на образцах каждого органа и ткани (таблица 3). Среднее значение относительной погрешности определения (δ) каждого аналита находилось в диапазоне $\pm 15\%$, а RSD рассчитанных концентраций не превышал допустимые 15% . При межсерийной оценке метрологических характеристик методики были объединены результаты всех 16 аналитических серий. Величина δ для R004

составила $0,17\text{--}2,86\%$, для M1 – $1,77\text{--}2,27\%$, для M2 – $1,95\text{--}3,52\%$. Значение RSD полученных данных на каждом уровне концентраций составляло менее $8,99\%$ (таблица 3).

При двукратном разведении гомогенатов печени с концентрацией аналитов Dil холостым образцом правильность и прецизионность результатов сохранялась на требуемом уровне. Так, δ для R004 составила $-2,27\%$, δ для M1 – $-1,71\%$, δ для M2 – $-1,35\%$, а величина RSD не превышала 15% .

Таблица 3. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксиамида и его метаболитов в органах и тканях крысы

Table 3. Results of evaluation of accuracy and precision of the method of quantification 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 rat organs and tissues

Испытание Test		Концентрация Concentration	R004		M1		M2	
			δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %
Внутрисерийная правильность и прецизионность Intraday accuracy and precision	Печень (2 серии, $n = 12$) Liver (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	0,40	6,09	0,79	7,22	4,91	5,90
		LQC	3,46	2,52	1,94	4,64	6,13	2,56
		MQC	1,37	2,90	6,05	3,30	5,21	3,42
		HQC	3,37	3,69	3,88	2,80	4,39	2,72
	Почки (2 серии, $n = 12$) Kidneys (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	2,61	6,29	2,08	10,37	5,67	7,91
		LQC	2,12	3,78	1,21	5,72	4,71	5,08
		MQC	2,78	2,58	2,33	6,49	3,89	4,26
		HQC	0,81	4,73	-0,03	4,29	0,96	4,58
	Сердце (2 серии, $n = 12$) Heart (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	-1,52	7,40	2,63	8,27	6,07	7,74
		LQC	0,50	3,76	0,77	6,88	2,71	5,70
		MQC	2,16	4,75	-0,31	6,35	-0,68	5,47
		HQC	3,19	4,61	2,44	2,61	2,63	3,97
	Легкие (2 серии, $n = 12$) Lung (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	-5,20	7,04	-7,24	8,41	-5,85	8,16
		LQC	-3,02	3,89	-2,31	6,54	-2,69	8,21
		MQC	1,71	3,37	-0,98	6,13	-0,06	5,02
		HQC	1,24	4,74	1,04	2,03	1,77	2,93
	Селезенка (2 серии, $n = 12$) Spleen (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	0,14	9,39	3,32	10,32	2,26	9,14
		LQC	2,66	2,77	2,17	6,01	1,95	5,77
		MQC	4,65	4,17	3,80	3,29	3,10	3,50
		HQC	5,96	3,63	1,83	2,95	1,64	4,32
	Мозг (2 серии, $n = 12$) Brain (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	5,61	6,68	8,25	7,85	7,95	7,58
		LQC	3,00	2,57	5,01	2,54	3,01	4,74
		MQC	3,16	3,01	2,66	5,20	3,86	4,86
		HQC	3,20	3,57	2,77	1,64	2,07	2,83
	Кожа (2 серии, $n = 12$) Skin (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	-1,77	6,51	1,09	6,27	3,38	8,13
		LQC	1,30	4,13	1,40	6,33	2,13	5,51
		MQC	-0,73	2,79	-1,12	5,50	-0,36	6,53
		HQC	-0,16	4,26	-0,11	3,59	-0,62	3,80
	Мышцы (2 серии, $n = 12$) Muscles (2 batches, $n = 12$)	LLOQ	1,07	7,87	7,23	5,67	3,80	5,16
		LQC	5,22	2,66	6,57	2,96	6,06	3,64
		MQC	3,46	4,36	4,89	4,13	4,39	5,48
		HQC	5,30	3,77	2,33	4,23	2,79	2,66
Межсерийная правильность и прецизионность (16 серии, $n = 96$) Interday accuracy and precision (16 bathes, $n = 96$)		LLOQ	0,17	7,58	2,27	8,99	3,52	8,20
		LQC	1,90	3,88	2,09	5,71	3,00	5,70
		MQC	2,32	3,76	2,17	5,56	2,42	5,19
		HQC	2,86	4,44	1,77	3,28	1,95	3,66

Краткосрочная стабильность, стабильность анализов после 3 циклов заморозки и разморозки в гомогенатах, а также стабильность анализов в приготовленных пробах были доказаны на образцах печени (таблица 4). Долгосрочная стабильность R004, M1 и M2 была подтверждена в гомогенатах каждого исследуемого органа и ткани (таблица 4). Оценка воспроизводимости при повторном введении проводилась на валидационной серии образцов печени. Данная серия анализировалась спустя 36 ч после первого введения. Величина δ для R004 была в диапазоне $-0,761-3,761\%$, для M1 – $1,08-2,27\%$, для M2 – $0,29-7,36\%$. Значение RSD рассчитанных концентраций на уровнях LLOQ, LQC, MQC, HQC для R004 было менее $11,77\%$, для M1 – менее $8,55\%$, для M2 – менее $8,08\%$. Данные результаты отвечают критериям приемлемости.

После успешной валидации разработанной методики проводился анализ испытуемых образцов органов и тканей крыс. Действующее вещество обнаружено во всех изучаемых биологических объектах (таблица 5). Тканевая биодоступность R004 уменьшается в следующем порядке (таблица 5): печень > кожа > почки > легкие > мышцы > сердце > селезенка > мозг. Высокие значения данного параметра ($1,1-42,2$) вызваны липофильностью данного соединения. Фармакокинетические профили R004 в органах имеют мультипиковый характер (рисунок 3), как и фармакокинетические профили данного соединения в плазме [3]. Так, первый пик нарастания концентрации наступает через 1 ч после введения, второй пик – через 4 ч, третий пик – через 8–10 ч (за исключением печени). Это связано с энтерогепатической рециркуляцией действующего вещества (таблица 5).

Таблица 4. Изучение стабильности 5-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в гомогенатах органов

Table 4. Stability study of 5-(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 organ homogenates

Испытание Test		% отклонения от номинального значения % of deviation from nominal value					
		R004		M1		M2	
		LQC (n = 6)	HQC (n = 6)	LQC (n = 6)	HQC (n = 6)	LQC (n = 6)	HQC (n = 6)
Краткосрочная стабильность (комнатная температура, 24 ч) Short-term stability (room temperature, 24 h)		3,82	4,87	4,87	4,00	5,48	2,89
Стабильность после 3 циклов заморозки (12 ч) и разморозки (4 ч) Stability after 3 cycles of freeze (12 h) and thaw (4 h)		5,25	5,75	1,75	0,75	0,76	3,13
Стабильность в автосемплере (температура +4 °C, 48 ч) Autosampler stability (temperature +4 °C, 48 h)		2,80	5,61	3,64	2,20	5,48	3,35
Долгосрочная стабильность в морозильной камере (не выше –70 °C, 30 дней) Long-term stability at freezer (no higher than –70 °C, 30 days)	Печень Liver	2,53	2,04	5,04	1,16	3,54	2,27
	Почки Kidneys	1,94	2,61	3,62	–1,66	4,71	0,74
	Сердце Heart	0,95	0,48	0,23	–2,14	3,81	–1,04
	Легкие Lung	1,16	0,84	0,10	–0,62	–1,16	0,13
	Селезенка Spleen	2,20	0,57	5,23	0,95	0,52	0,09
	Мозг Brain	2,71	3,03	4,57	1,20	–3,22	–1,20
	Кожа Skin	5,60	3,10	5,68	1,37	0,71	2,96
	Мышцы Muscles	4,54	5,52	6,46	2,76	6,02	2,39



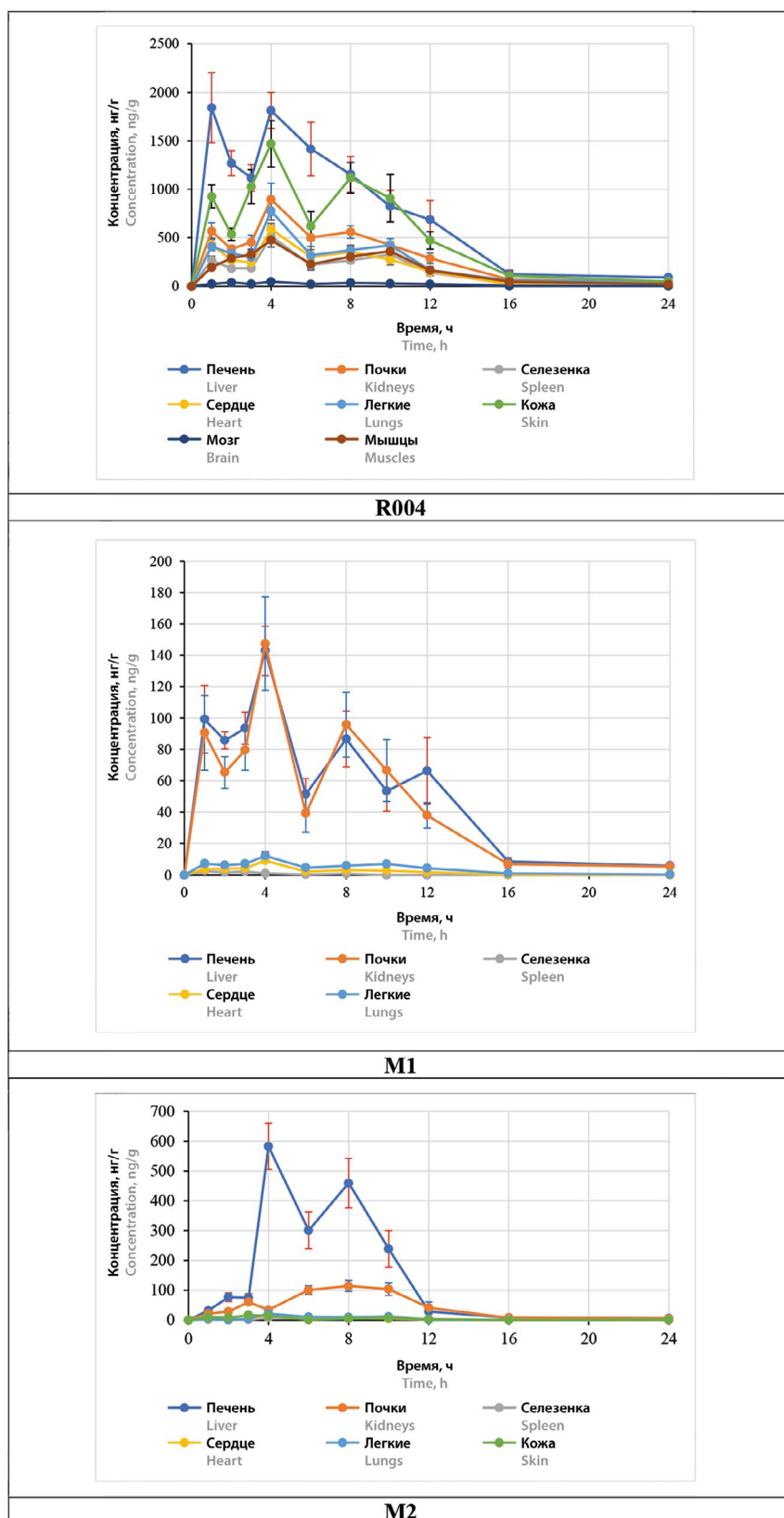


Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические кривые (со стандартной ошибкой среднего) 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксиамида и его метаболитов в органах и тканях крысы

Figure 3. Averaged pharmacokinetic curves (with standard error of mean) of 5-(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 rat organs and tissues

Таблица 5. Рассчитанные значения фармакокинетических параметров 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксиамида и его метаболитов в органах и тканях крысы

Table 5. Calculated values of pharmacokinetic parameters 5-(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 rat organs and tissues

Орган Organs	Аналит Analyte	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	MRT, ч MRT, h	F_t
Печень Liver	R004	1840,2	1	16528,0	17081,0	6,9	42,2
	M1	142,8	4	1095,7	1128,4	7,2	21,0
	M2	582,7	4	3083,1	3105,5	6,9	132,0
Почки Kidneys	R004	896,3	4	7024,1	7317,3	7,5	17,9
	M1	147,4	4	993,0	1021,2	7,1	19,0
	M2	114,4	8	961,3	983,4	8,4	41,2
Сердце Heart	R004	588,3	4	4053,2	4103,0	7,6	10,4
	M1	9,2	4	44,2	76,2	9,2	0,8
	M2	15,9	4	60,1	64,2	5,9	2,6
Легкие Lung	R004	777,5	4	5369,8	5786,7	6,3	13,7
	M1	12,3	4	93,1	95,7	7,5	1,8
	M2	21,6	4	108,1	111,0	7,1	4,6
Селезенка Spleen	R004	515,0	4	3618,3	3821,5	7,7	9,2
	M1	2,6	1	9,9	14,4	3,2	0,2
	M2	8,2	4	50,8	57,3	6,7	2,2
Кожа Skin	R004	1468,7	4	11833,0	12059,0	7,4	30,2
	M2	16,8	3	94,8	110,1	7,3	4,1
Мозг Brain	R004	48,4	4	416,6	433,7	7,6	1,1
Мышцы Muscles	R004	475,8	4	4077,5	4207,2	7,8	10,4

Метаболиты М1 и М2 обнаружены в тканях печени, почек, а также в меньших количествах в высокоvascularизированных органах: сердце, селезенке и легких (рисунок 3, таблица 5). Следовые количества М2 идентифицированы также в коже крыс. Через гематоэнцефалический барьер метаболиты не проходят. На фармакокинетических профилях М1 наблюдается 3 пика нарастания концентрации, как и у действующего вещества (рисунок 3). Величина тканевой биодоступности М1 снижается в следующем порядке: печень > почки > легкие > сердце > селезенка. C_{max} метаболита М2 в печени достигается спустя 4 ч после введения препарата. Ее величина составляет 582,7 нг/г, что приблизительно в 4 раза выше, чем C_{max} М1. Такое накопление М2 вызвано низким уровнем ренальной экскреции М2 [2]. Тканевая биодоступность М2 изменяется в том же порядке, что и у М1 (за исключением кожи): печень > почки > легкие > кожа > сердце > селезенка. Таким образом, метаболиты проникают в изучаемые биологические объекты хуже действующего вещества. Наибольшее содержание М1 и М2 наблюдается в органах экскреции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоаналитическая методика определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксиамида и его метаболитов в органах и тканях была успешно валидирована и использована при изучении распределения субстанции. Действующее вещество хорошо распределяется по всем изучаемым органам и тканям. Наибольшее содержание R004 наблюдается в печени, коже и почках, наименьшее содержание – в головном мозге. Высокие концентрации метаболитов М1 и М2 обнаружены в печени и почках. В сердце, легкие и селезенку данные соединения проникают в значительно меньших количествах. В тканях кожи идентифицирован только М2. Концентрации М1 и М2 в мышцах и головном мозге находились ниже предела количественного определения методики.

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-dihydroi-

- soxazol-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/rpharmacology.9.10061.
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 derivate. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(2):83–95. DOI: 10.18413/rpharmacology.10.482.
3. Яичков И. И., Корсаков М. К., Вольхин Н. Н., Петухов С. С., Тюшина А. Н., Зайкова В. Е., Лазарянц О. Э. Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамиды на крысах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):238–250. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876. [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. Liang D., Wu Z., Liu Y., Li C., Li X., Yang B., Xie H., Sun H. HPLC-MS/MS-Mediated Analysis of the Pharmacokinetics, Bioavailability, and Tissue Distribution of Schisandrol B in Rats. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2021;2021:8862291. DOI: 10.1155/2021/8862291.
5. Hu H., Xiao H., Bao H., Li M., Xue C., Li Y. T., Wang G., Chen S., Huang Y., Zheng L., Wang A., Li Y. J., Gong Z. P. Tissue Distribution Comparison of Six Active Ingredients from an Eucommiae Cortex Extract between Normal and Spontaneously Hypertensive Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020;2020:1–16. DOI: 10.1155/2020/2049059.
6. Körmöczi T., Szabó Í., Farkas E., Penke B., Janáky T., Ilisz I., Berkecz R. Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry for determination of N,N-dimethyltryptamine in rat plasma and brain; Method development and application *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;191:113615. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113615.
7. Kusuma Kumari G., Krishnamurthy P. T., Ravi Kiran Ammu V. V. V., Vishwanath K., Narendran S. T., Babu B., Krishnaveni N. Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for pioglitazone: application towards pharmacokinetic and tissue distribution study in rats. *RSC Advances*. 2021;11:11437–11443. DOI: 10.1039/d1ra01126j.
8. Liu J., Pang Y., Li W., Sun J., He Y., Guo Y., Dong J. Impact of hepatic impairment and renal failure on the pharmacokinetics of linezolid and its metabolites: contribution of hepatic metabolism and renal excretion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2025;69(5):e0189224. DOI: 10.1128/aac.01892-24.
9. Ramöller I. K., Abbate M. T. A., Vora L. K., Hutton A. R. J., Peng K., Volpe-Zanutto F., Tekko I. A., Moffatt K., Paredes A. J., McCarthy H. O., Donnelly R. F. HPLC-MS method for simultaneous quantification of the antiretroviral agents rilpivirine and cabotegravir in rat plasma and tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022;213:114698. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.114698.
10. Rosebooma I. C., Thijssena B., Rosinga H., Alvesb F., Mondalc D., Teunissend M. B. M., Beijnen J. H., Dorloa T. P. C. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the quantification of the anti-leishmanial drug miltefosine in human skin tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022;207:114402. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114402.
11. Sheng Y.-H., Siemiątkowska A., Kosicka-Noworzyń K., Brunetti L., Kagan L. A validated LC-MS/MS method for simultaneous quantitation of piperacillin, cefazolin, and cefoxitin in rat plasma and twelve tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2024;248:116259. DOI: 10.1016/j.jpba.2024.116259.
12. Yin W., Al-Wabli R. I., Attwa M. W., Rahman A. F. M. M., Kadi A. A. Detection and characterization of simvastatin and its metabolites in rat tissues and biological fluids using MALDI high resolution mass spectrometry approach. *Scientific Reports*. 2022;12(1):4757. DOI: 10.1038/s41598-022-08804-x.