



Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения нового производного сиднонимина и его метаболитов в плазме крови кроликов

Н. С. Попов¹, Д. А. Гавриленко¹, М. С. Баранов^{2,4}, Д. Е. Каурова^{2✉}, И. Н. Мяснянко^{2,4},
И. А. Солоха³, В. Ю. Балабаньян²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава). 170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России). 117513, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

³ Тверской филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (Тверской филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ»). 170007, Россия, г. Тверь, ул. Шишкова, д. 100

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН). 117997, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Коньково, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1

✉ Контактное лицо: Каурова Диана Евгеньевна. E-mail: berseneva_diana@mail.ru

ORCID: Н. С. Попов – <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>;

Д. А. Гавриленко – <https://orcid.org/0009-0003-8692-0878>;

М. С. Баранов – <https://orcid.org/0000-0002-9339-7603>;

Д. Е. Каурова – <https://orcid.org/0000-0002-6261-9832>;

И. Н. Мяснянко – <https://orcid.org/0000-0002-2168-3555>;

И. А. Солоха – <https://orcid.org/0009-0003-9918-6342>;

В. Ю. Балабаньян – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>.

Статья поступила: 05.08.2025

Статья принята в печать: 26.02.2026

Статья опубликована: 24.04.2026

Резюме

Введение. ВВР2023 – новый лекарственный кандидат группы сиднонимин, обладающий церебральной вазодилатирующей активностью и прокогнитивными свойствами. Фармакологические эффекты ВВР2023 обусловлены наличием активных метаболитов. Для проведения фармакокинетических исследований на доклиническом этапе необходимо разработать биоаналитическую методику определения ВВР2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов.

Цель. Разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения нового производного сиднонимина и его метаболитов в плазме крови кроликов.

Материалы и методы. Количественное определение ВВР2023 в плазме крови кроликов проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В процессе пробоподготовки биоматериала применяли способ осаждения белков метанолом. Хроматографическое разделение проводили смесью деионизированной воды и ацетонитрила в градиентном режиме на колонке ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм, с помощью хроматографа Agilent 1260 Infinity II. Детектирование осуществляли в режиме MRM с использованием масс-спектрометра AB Sciex QTRAP 3200 MD. В качестве внутреннего стандарта применяли N-(этоксикарбонил)-3-(4-метилпентан-2-ил)сиднонимин.

Результаты и обсуждение. Разработана методика пробоподготовки плазмы крови кроликов, подобраны оптимальные условия хроматографирования и детектирования исследуемого соединения и его метаболитов. Биоаналитическая методика валидирована по следующим показателям: селективности, матричному эффекту, степени извлечения, переносу пробы, линейности калибровочного диапазона, нижнему пределу количественного определения, внутри- и межсерийной точности и прецизионности, а также стабильности аналитов и внутреннего стандарта на этапах анализа.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения нового производного сиднонимина ВВР2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов с применением ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны для ВВР2023, ВВР2023 А и ВВР2023 С составили 5,0–500,0 нг/мл (5,0–1000,0 нг/мл для геранамин). Методика

была использована при проведении аналитической части доклинического фармакокинетического исследования BBP2023 на кроликах.

Ключевые слова: биотрансформация, фармакокинетика, сиднонимины, вазодилататоры, хромато-масс-спектрометрия

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

Вклад авторов. Н. С. Попов – масс-спектрометрическая идентификация метаболитов, разработка биоаналитической методики, подготовка рукописи. Д. А. Гавриленко – анализ литературных источников, проведение биологической части исследования, анализ результатов, подготовка рукописи. М. С. Баранов – разработка концепции исследования, синтез метаболитов, подготовка рукописи. Д. Е. Каурова – обзор литературы, анализ полученных результатов, подготовка рукописи. И. Н. Мяснянко – разработка концепции исследования, синтез метаболитов, подготовка рукописи. И. А. Солоха – выполнение оперативных вмешательств у лабораторных животных, подготовка рукописи. В. Ю. Балабаньян – постановка цели, разработка дизайна исследования, подготовка рукописи.

Финансирование. Данное исследование было выполнено в рамках государственного задания, номер госрегистрации – 124020900020-4.

Для цитирования: Попов Н. С., Гавриленко Д. А., Баранов М. С., Каурова Д. Е., Мяснянко И. Н., Солоха И. А., Балабаньян В. Ю. Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения нового производного сиднонимина и его метаболитов в плазме крови кроликов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(2):154–170. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2164>

Development and validation of HPLC-MS/MS technique for the quantitative determination of a new derivative of sydnonymine and its metabolites in rabbit plasma

Nikita S. Popov¹, Dmitry A. Gavrilenko¹, Mikhail S. Baranov^{2, 4}, Diana E. Kaurova²✉, Ivan N. Myasnyanko^{2, 4}, Ivan A. Solokha³, Vadim Yu. Balabanyan²

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tver State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 4, Sovetskaya str., Tver, 170100, Russia

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "N.I. Pirogov Russian National Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Pirogov Russian National Research Medical University). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117513, Russia

³ Tver Branch of Federal State-Financed Institution «Federal Centre for Animal Health» (FGBI «ARRIAH»). 100, Shishkova str., Tver, 170007, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (IBCh RAS). Building 1, 16/10, Miklukho-Maklaya str., intra-city territory of a federal city Konkovo, Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Diana E. Kaurova. **E-mail:** berseneva_diana@mail.ru

ORCID: Nikita S. Popov – <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>;
Dmitry A. Gavrilenko – <https://orcid.org/0009-0003-8692-0878>;
Mikhail S. Baranov – <https://orcid.org/0000-0002-9339-7603>;
Diana E. Kaurova – <https://orcid.org/0000-0002-6261-9832>;
Ivan N. Myasnyanko – <https://orcid.org/0000-0002-2168-3555>;
Ivan A. Solokha – <https://orcid.org/0009-0003-9918-6342>;
Vadim Yu. Balabanyan – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>.

Received: 05.08.2025

Accepted: 26.02.2026

Published: 24.04.2026

Abstract

Introduction. BBP2023 is a new drug candidate of the sydnonymine group with cerebral vasodilating activity and procognitive properties. The pharmacological effects of BBP2023 are due to the presence of active metabolites. To conduct pharmacokinetic studies at the preclinical stage, it is necessary to develop a bioanalytical method for the determination of BBP2023 and its metabolites in rabbit blood plasma.

Aim. Development and validation of a chromatography-mass spectrometric method for the quantitative determination of a new derivative of sydnonymine and its metabolites in rabbit blood plasma.

Materials and methods. Quantitative determination of BBP2023 in rabbit blood plasma was performed by HPLC-MS/MS. The biomaterial sample preparation was based on the method of protein precipitation with methanol. Chromatographic separation was performed with a mixture of deionized water and acetonitrile in a gradient mode on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 analytical column (4.6 × 50 mm, 5 μm) using an Agilent 1260 Infinity II chromatograph. Detection was performed in the MRM mode using an AB Sciex QTRAP 3200 MD mass spectrometer. N-(ethoxycarbonyl)-3-(4-methylpentan-2-yl)sydnonymine was used as the internal standard.

Results and discussion. The method for sample preparation of rabbit blood plasma has been developed, optimal conditions for chromatography and detection of the studied compound and its metabolites have been selected. The bioanalytical method has been validated according to the following parameters: selectivity, matrix effect, recovery rate, carry-over effect, linearity of the calibration range, lower limit of quantitative determination, intra- and inter-run accuracy and precision, as well as stability of analytes and the internal standard at the analysis stages.

Conclusion. A method for the quantitative determination of a new derivative of sydnonymine BBP2023 and its metabolites in rabbit blood plasma using HPLC-MS/MS has been developed and validated. The confirmed analytical ranges for BBP2023, BBP2023 A and BBP2023 C were 5.0–500.0 ng/ml (5.0–1000.0 ng/ml for geranamine). The method was used in the analytical part of the preclinical pharmacokinetic study of BBP2023 in rabbits.

Keywords: biotransformation, pharmacokinetics, sydnonymines, vasodilators, chromatography-mass spectrometry

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. Nikita S. Popov – mass spectrometric metabolite identification, bioanalytical method development, manuscript preparation. Dmitry A. Gavrilenko – literature review, biological study execution, results analysis, manuscript preparation. Mikhail S. Baranov – research concept development, metabolite synthesis, manuscript preparation. Diana E. Kaurova – literature review, results analysis, manuscript preparation. Ivan N. Myasnyanko – research concept development, metabolite synthesis, manuscript preparation. Ivan A. Solokha – Surgical procedures on laboratory animals, manuscript preparation. Vadim Yu. Balabanyan – study objective formulation, research design development, manuscript preparation.

Funding. This study was performed as part of a state-funded research project, state registration number – 124020900020-4.

For citation: Popov N.S., Gavrilenko D.A., Baranov M.S., Kaurova D.E., Myasnyanko I.N., Solokha I.A., Balabanyan V.Yu. Development and validation of HPLC-MS/MS technique for the quantitative determination of a new derivative of sydnonymine and its metabolites in rabbit plasma. *Drug development & registration*. 2026;15(2):154–170. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2164>

ВВЕДЕНИЕ

Профилактика и лечение сосудистых заболеваний центральной нервной системы являются актуальной проблемой клинической неврологии [1]. Острые нарушения мозгового кровообращения имеют высокую частоту встречаемости и являются одной из основных причин смертности и инвалидности во всем мире [2–5]. Также большую распространенность имеет хроническая ишемия головного мозга (дисциркуляторная энцефалопатия, ДЭ) – медленно прогрессирующая дисфункция головного мозга, причиной которой является диффузное или мелкоочаговое повреждение мозговой ткани в условиях длительно существующей недостаточности церебрального кровоснабжения [6–8]. К основным проявлениям ДЭ относят снижение когнитивных способностей; аффективные, экстрапирамидные, мозжечковые, вестибулярные, псевдобульбарные и другие нарушения. Кроме того, расстройства кровоснабжения мозга могут быть причинами развития депрессии [9, 10], тревожных расстройств [11–13], эмоциональной лабильности [14], а также важным фактором риска развития инсульта [1].

На данный момент наиболее эффективным и патогенетически обоснованным подходом к терапии ДЭ является воздействие прежде всего на сосудистые факторы риска. К основным фармакотерапев-

тическим средствам, рекомендованным для терапии ДЭ, относятся антигипертензивные препараты (ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, антагонисты рецепторов ангиотензина), антиагреганты, статины, средства, влияющие на функции эндотелия (доноры NO, ингибиторы фосфодиэстераз, активаторы и стимуляторы гуанилатциклазы, иные вазодилататоры). Однако терапия дисциркуляторной энцефалопатии далека от совершенства, поскольку используемые лекарственные средства имеют ряд недостатков, обусловленных недостаточной эффективностью, побочными действиями, индивидуальными реакциями. Принимая во внимание мультифакторность патогенеза заболевания, можно прийти к заключению, что актуальным остается изыскание новых средств, реализующих свой фармакологический эффект посредством взаимодействия с разными мишенями.

С учетом значимой роли оксида азота (NO) в регуляции тонуса сосудов одним из направлений разработки центральных вазодилататоров является исследование донаторов NO [15]. Ограничение применения с этой целью классических донаторов оксида азота (нитропруссид натрия, нитроглицерин) обусловлено нежелательными эффектами, в первую очередь развитием гипотонии [16]. Исходя из этого актуальным является поиск центральных вазоди-

лататоров – донаторов NO, обладающих тропизмом к мозговой ткани. Перспективной химической группой для разработки препаратов с данными свойствами являются сиднонимины [17], представителем которых является лекарственный кандидат BVP2023 (N-(этоксикарбонил)-3-(4-метилгексан-2-ил)сиднонимин). Пилотные исследования данного соединения позволили выявить наличие у него церебральной вазодилатирующей активности в сочетании с прогностическими свойствами [18]. По результатам скрининговых исследований биотрансформации у мышей, кроликов и крыс установлено, что соединение BVP2023 метаболизируется в печени путем отщепления этоксикарбонильной группы, образуя нестойкий при физиологических значениях pH промежуточный продукт BVP2023 A (4-метилгексан-2-ил)сиднонимин). Данное соединение самопроизвольно распадается в плазме крови с высвобождением оксида азота и образованием промежуточного продукта метаболизма BVP2023 C ((4-метилгексан-2-ил)аминоацетонитрил) [19–20]. Дальнейший путь биотрансформации приводит к образованию геранамина (4-метилгексан-2-амин), также являющегося активным метаболитом с известной психостимулирующей активностью¹.

Для доклинического исследования фармакокинетики лекарственного кандидата BVP2023 необходимо провести разработку и валидацию бионалитической методики, позволяющей одновременно количественно определить исходное соединение и вышеописанные метаболиты в плазме крови кроликов.

Цель исследования: разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения нового производного сиднонимина и его метаболитов в плазме крови кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и расходные материалы

Для разработки методики применяли стандартные образцы исследуемого препарата и его метаболитов: BVP2023 ((5Z)-5-[(этоксикарбонил)имино]-3-(4-метилгексан-2-ил)-5H-1,2,3-оксадиазол-3-ий-2-ид, вязкая жидкость, содержание вещества 99,8 %, серия LOT 1309, годен до 31.03.2026 г.); BVP2023 A (5-имино-3-(4-метилгексан-2-ил)-5H-1,2,3-оксадиазол-3-ий-2-ида гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание вещества более 95 %, серия LOT 1306, годен до 30.11.2025 г.); BVP2023 C ((4-метилгексан-2-ил)аминоацетонитрил), жидкость, содержание вещества 85,5 %, серия LOT 1321, годен до 30.11.2025 г.); гер-

намин (4-метилгексан-2-амин) гидрохлорид, содержание вещества 98 %, серия LOT C16037674, CAS: 13803-74-2, годен до 15.06.2025 г.), внутренний стандарт (IS, (5Z)-5-[(этоксикарбонил)имино]-3-(4-метилпентан-2-ил)-5H-1,2,3-оксадиазол-3-ий-2-ид, вязкая жидкость, содержание вещества – более 95 %, серия LOT 1318, годен до 15.10.2025 г.). Все вещества, за исключением геранамина (Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., Ltd., Китай), были синтезированы в научно-исследовательской лаборатории химии лекарственных субстанций НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, структурные формулы представлены на рисунке 1.

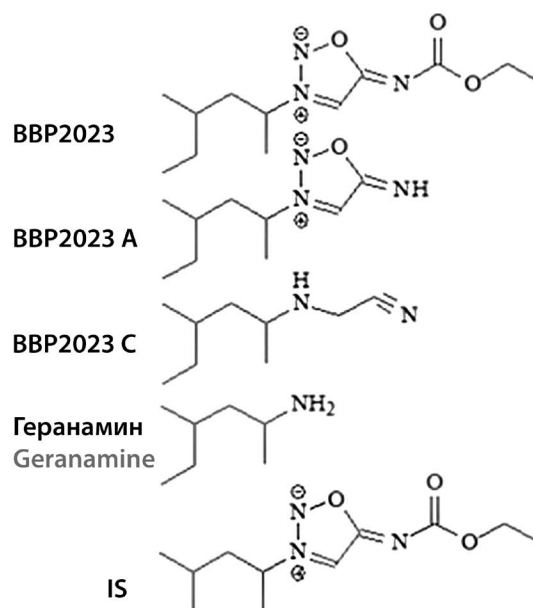


Рисунок 1. Структурные формулы BVP2023, его метаболитов и внутреннего стандарта

Figure 1. Structural formulas of BVP2023, its metabolites, and internal standard

Для приготовления растворов и проведения хроматографического анализа использовали ацетонитрил для ВЭЖХ-МС (Scharlau, Испания), метанол для ВЭЖХ (J.T. Backer, Нидерланды), муравьиную кислоту (ч., PanReas Applichem, Испания), лимонную кислоту (х.ч., PanReas Applichem, Испания), двузамещенный фосфат натрия (х.ч., PanReas Applichem, Испания), деионизированную воду (удельное сопротивление 18,2 МΩ, Milli-Q). Калибровочные и контрольные образцы готовили на интактной плазме крови кроликов.

В процессе разработки и валидации методики использовали нестерильные наконечники различного объема для автоматических дозаторов и микроцентрифужные пробирки типа «эппендорф» (Zhejiang Gongdong Medical Technology Co., Ltd., Китай).

¹ Решение Совета Евразийского экономического союза от 03.11.2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107/> Ссылка активна на 17.10.2025.

Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение BBP2023 и его метаболитов выполняли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия), оснащенного четырехканальным градиентным насосом (G7111B) со встроенным блоком дегазации, автоматическим пробоотборником (G7129A), термостатом колонок (G1316A). Детектирование осуществляли с помощью масс-спектрометра типа «тройной квадруполь» AB Sciex QTRAP 3200 MD (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур).

При разработке биоаналитической методики применяли следующее оборудование: весы аналитические ВЛ-124В (ООО «НПП «Госметр», Россия), вортекс V-1 plus (SIA Biosan, Латвия), автоматические пипетки переменного объема Research Plus (Eppendorf, Германия), термостатируемый шейкер TS-100C (SIA Biosan, Латвия). Хранение биологических образцов и стандартных растворов осуществляли в морозильных шкафах LGT 3725 (Liebherr, Австрия) и MDF-193 (SANYO, Япония) соответственно. Получение плазмы крови и супернатанта в процессе пробоподготовки осуществляли с помощью центрифуг LMC-4200R (SIA Biosan, Латвия) и D-37520 (SIGMA, Германия) соответственно. Деионизированную воду получали с помощью лабораторной системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция).

Приготовление исходных и рабочих растворов

Исходные растворы исследуемых веществ приготовлены путем растворения точных навесок (BBP2023 – 200 мг, BBP2023 A и геранамин в пересчете на основание – 200 мг, BBP2023 C с учетом содержания вещества в субстанции – 234 мг) в метаноле с добавлением 0,05%-й (по объему) муравьиной кислоты в мерных колбах вместимостью 100 мл (1 класс точности, ПАО «Химлаборприбор», Россия). Таким образом, концентрация каждого вещества в индивидуальных исходных растворах составила 2 мг/мл.

Из исходных растворов готовили 10-кратные комбинированные рабочие растворы с равным содержанием анализируемых веществ, которые затем были использованы для приготовления калибровочных (k) образцов в 8 уровнях концентраций и образцов контроля качества (QC) в 5 уровнях концентраций: LLOQ (нижний предел количественного определения), L (низкий), M1 и M2 (средние), H (высокий) – в плазме крови кроликов (таблица 1).

Для приготовления исходного раствора внутреннего стандарта (IS) навеску субстанции массой 50 мг вносили в мерную колбу объемом 25 мл и растворяли в метаноле, концентрация полученного раствора составила 2,0 мг/мл. Из исходного раствора внутрен-

него стандарта готовили раствор с концентрацией 100 нг/мл в метаноле с добавлением 0,1%-й муравьиной кислоты, который использовали для извлечения аналитов и осаждения белков в процессе пробоподготовки биоматериала. Исходные и рабочие растворы хранили при температуре –40 °С не более 2 месяцев.

Пробоподготовка

С учетом того факта, что метаболит BBP2023 A самопроизвольно распадается при физиологических значениях pH крови, получение биоматериала с использованием общепринятых антикоагулянтов (соли ЭДТА, гепарин) в настоящем эксперименте неприменимо. Для стабилизации активного метаболита кровь собирали с помощью одноразовых медицинских шприцев объемом 1 мл, в которые заранее вносили 10 мкл 2М цитратного буферного раствора со значением pH = 1,9, переносили в одноразовые пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Для выбора способа пробоподготовки были приготовлены образцы плазмы крови кроликов с индивидуальной концентрацией каждого аналита 100 нг/мл. На предварительном этапе сравнивали степень извлечения каждого определяемого вещества при осаждении белков ацетонитрилом или метанолом, а также при применении жидкость-жидкостной экстракции гексаном или хлороформом. Альтернативным вариантом являлось использование твердофазной экстракции (ТФЭ), однако предпочтение отдавалось более доступным и быстрым способам пробоподготовки при достижении приемлемых значений степени извлечения.

Стандартные образцы, содержащие BBP2023 и его метаболиты, готовили следующим образом: 90 мкл интактной плазмы крови переносили в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл. Добавляли 10 мкл соответствующего 10-кратного комбинированного рабочего раствора (таблица 1) и перемешивали на вортексе. Нулевые пробы были приготовлены путем добавления 10 мкл метанола к 90 мкл плазмы.

Для приготовления анализируемых растворов и подвижной фазы использовали стеклянные мерные колбы и цилиндры различного объема (класс точности 1). Хроматографическое разделение BBP2023 и его метаболитов выполняли на аналитической колонке ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США), в сочетании с предколонкой Phenomenex C18, 4,0 × 3 мм (Phenomenex, США).

Для обработки первичных данных хроматографического анализа применяли программное обеспечение (ПО) AB Sciex Analyst (ver. 1.3.6), Sciex, США; статистический анализ результатов выполняли с помощью ПО StatPlus (ver. 7), AnalystSoft Inc., США.

Таблица 1. Калибровочные и контрольные образцы нового производного сиднонимина и его метаболитов в плазме крови кроликов

Table 1. Calibration samples and control samples of the new derivative of sydnonimine and its metabolites in rabbit blood plasma

Уровень Concentration level	Маркировка образца Sample name	Концентрация в биообразце, нг/мл Biosample concentration, ng/ml	Концентрация 10-кратного рабочего раствора в метаноле, нг/мл Concentration of tenfold work solution in methanol, ng/ml
Калибровочные образцы Calibration samples			
1	k 5	5	50
2	k 10	10	100
3	k 20	20	200
4	k 50	50	500
5	k 100	100	1000
6	k 200	200	2000
7	k 500	500	5000
8	k 1000	1000	10000
Образцы контроля качества для ВВР2023, ВВР2023 А, ВВР2023 С Quality control samples for ВВР2023, ВВР2023 А, ВВР2023 С			
LLOQ	QC 5	5	50
L	QC 15	15	150
M	QC 200	200	2000
H	QC 400	400	4000
Образцы контроля качества для геранамина Quality control samples for geranamine			
LLOQ	QC 5	5	50
L	QC 15	15	150
M	QC 400	400	4000
H	QC 800	800	8000

Валидация биоаналитической методики

В процессе валидации оценивались следующие параметры биоаналитической методики: селективность, матричный эффект, перенос пробы, степень извлечения, линейность калибровочного диапазона, нижний предел количественного определения (LLOQ),

внутри- и межсерийная точность и прецизионность, а также стабильность аналитов на этапах анализа. Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями^{1,2}.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка биоаналитической методики

Для выбора условий масс-спектрометрического детектирования, обеспечивающих наибольшую чувствительность, растворы анализируемых веществ и IS (50 нг/мл) в 50%-м метаноле с добавлением 0,1%-й муравьиной кислоты анализировали путем прямого ввода в масс-спектрометр при помощи шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин при ионизации электрораспылением (ESI) в режиме регистрации положительных ионов.

При сканировании в режиме полного ионного тока (MS1) определяли m/z ионов-предшественников для ВВР2023, его метаболитов и IS, основные ионы-продукты регистрировали в режиме Product Ion (MS2). Для количественного анализа была проведена оптимизация МС/МС-методики в режиме MRM для достижения максимальной чувствительности. Масс-спектры второго порядка показаны на рисунке 2, параметры детектирования представлены в таблице 2.

Для хроматографического разделения веществ использовали колонку ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм, с предколонкой Phenomenex C18, 4,0 × 3 мм. Разделение проводили в градиентном режиме, при скорости потока 0,6 мл/мин. В качестве подвижной фазы А использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы В использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (таблица 2), поток элюента в источник ионов детектора был направлен с 2,5 по 3,8 мин. На рисунке 3 представлен фрагмент общей хроматограммы стандартного образца плазмы крови кроликов с индивидуальной концентрацией каждого аналита 200 нг/мл.

Результаты оценки степени извлечения определяемых веществ из плазмы крови кроликов в процессе пробоподготовки при использовании способа жидкостной экстракции гексаном показали низ-

¹ Решение Совета Евразийского экономического союза от 03.11.2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107/> Ссылка активна на 17.10.2025.

² 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: 17.10.2025.

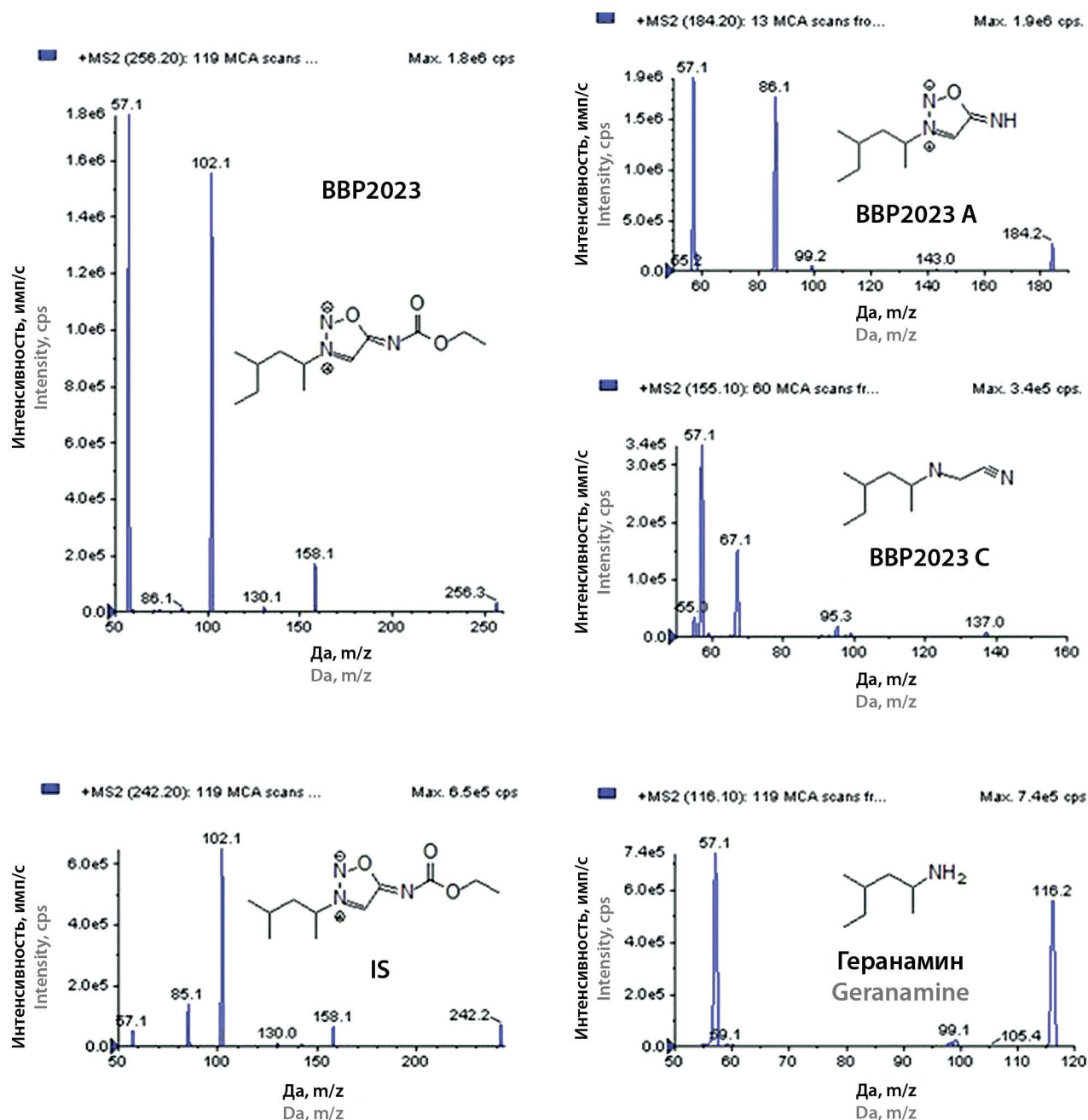


Рисунок 2. Масс-спектр второго порядка BBP2023, его метаболитов и внутреннего стандарта

Figure 2. Mass spectrum of product ions of BBP2023, its metabolites and internal standard

кие значения данного показателя для метаболитов BBP2023 C (в среднем 45 %) и BBP2023 A (в среднем 61 %). Для остальных веществ степень извлечения составила более 95 %. Применение в качестве экстрагента хлороформа характеризуется меньшими значениями степени извлечения для всех аналитов.

Альтернативным способом пробоподготовки биоматериала явилось осаждение белков органическим растворителем. Для выбора осадителя были приготовлены образцы плазмы крови кроликов с индиви-

дуальной концентрацией аналитов 100 нг/мл (pre-spike), образцы в растворителе (solvent-spike) и экстракты матрицы с добавкой аналитов (post-spike). Проводили подготовку образцов осаждением метанолом и ацетонитрилом и рассчитывали матричный эффект (ME, %) как отношение площади пика в образцах post-spike к площади пика в образце solvent-spike и степень извлечения (Recovery, %) как отношение площади пика в экстрагированном образце к площади пика в экстракте матрицы с добавкой аналитов.

Таблица 2. ВЭЖХ-МС/МС-параметры определения BBP2023 и его метаболитов
Table 2. HPLC-MS/MS parameters for the determination of BBP2023 and its metabolites

Хроматографические параметры Chromatographic parameters				
Элюент А Eluent A	0,1%-й (по объему) раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде 0,1 % (v/v) solution of formic acid in deionized water			
Элюент В Eluent B	0,1%-й (по объему) муравьиной кислоты в ацетонитриле 0,1 % (v/v) solution of formic acid in acetonitrile			
Хроматографическая колонка Chromatographic column	ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 x 50 mm, 5 µm			
Предколонка Guard column	Phenomenex C18, 4,0 × 3 мм Phenomenex C18, 4.0 x 3 mm			
Программа градиента Gradient program	Время, мин Time, min	Скорость потока, мкл/мин Flow rate, µL/min	% A	% B
	0,0	600	90	10
	2		0	100
	3,5		0	100
	3,6		90	10
	5		90	10
Промывка иглы инжектора Injector needle rinse	25%-й водный раствор метанола в течение 5 с 25 % aqueous methanol solution, 5 s			
Температура колонки, °C Column temperature, °C	30			
Объем ввода, мкл Injection volume, µL	10			
Время удерживания, мин Retention time, min	BBP2023	3,5		
	BBP2023 A	2,9		
	BBP2023 C	2,8		
	Геранамин Geranamine	2,7		
	IS	3,3		
Параметры масс-спектрометрической детекции Mass-spectrometric detection parameters				
Источник ионов Ion source	Turbo Ion Spray			
Режим ионизации Ionization mode	Положительный Positive			
Температура источника ионов, °C Ion source temperature, °C	450			
Напряжение ионизации, В Ionization voltage, V	5500			
Давление газа-завесы, psi Curtain gas pressure, psi	20			
Давление газа-распылителя, psi Spray gas pressure, psi	35			
Давление газа-нагревателя, psi Heater gas pressure, psi	45			
Потенциал на входе в ячейку соударений (EP), В Collision cell enter potential, V	10			

Аналит Analyte	MRM-переход, m/z MRM-transition, m/z	Dwell, мс Dwell, ms	Потенциал декластеризации (DP), В Declustering potential, V	Энергия соударений (CE), эВ Collision energy, V	Потенциал на выходе из ячейки соударений (CXP), В Collision cell exit potential, V
BBP2023	256,2/102,0 256,2/57,1	50	38,0	14,0 25,0	3,5 2,5
BBP2023 A	184,1/86,1 184,1/57,1	50	28,0	11,0 21,0	2,9 2,3
BBP2023 C	155,1/57,1 155,1/99,1	50	38,0	18,0 10,0	2,5 3,0
Геранамин Geranamine	116,1/57,1 116,1/99,1	50	32,0	16,0 10,0	2,3 3,2
IS	242,2/102,0 242,2/57,1	50	32,0	14,0 25,0	3,5 2,7

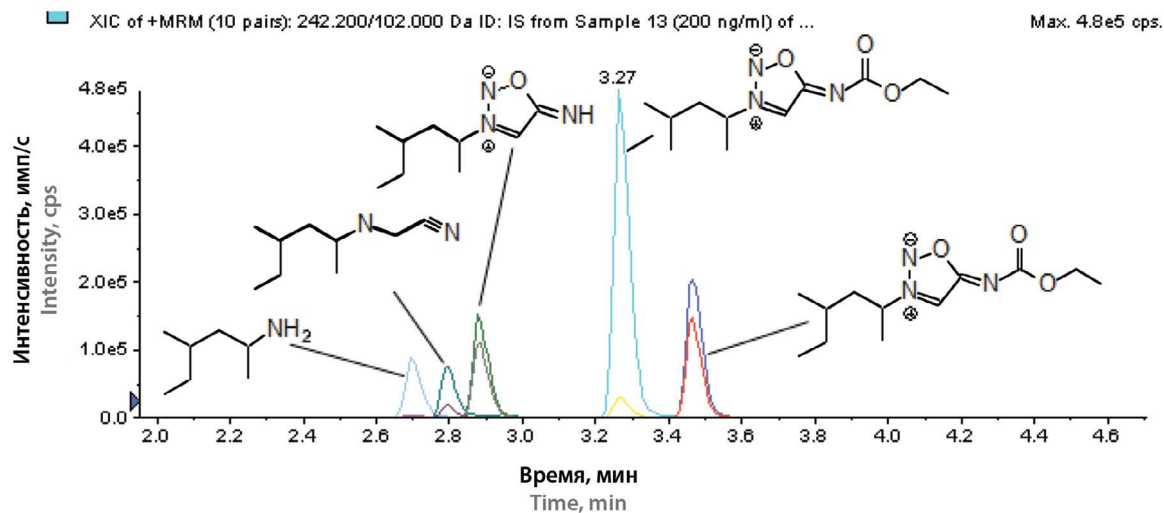


Рисунок 3. Фрагмент общей хроматограммы стандартного образца плазмы крови кроликов с индивидуальной концентрацией каждого аналита 200 нг/мл

Figure 3. Fragment of the total chromatogram of a standard sample of rabbit blood plasma with an individual concentration of each analyte of 200 ng/ml

Сравнение результатов при осаждении белков ацетонитрилом и метанолом показало, что оба подхода характеризуются высокими значениями степени извлечения при определении всех анализируемых веществ и приемлемыми значениями матричного эффекта для аналитов и внутреннего стандарта. Поэтому в качестве растворителя для осаждения белков использовали более доступный в лаборатории метанол с добавкой IS до концентрации 100 нг/мл. К данному раствору добавляли 0,1 % муравьиной кислоты с целью сохранения нестабильного в щелочной среде BBP2023 A при пробоподготовке и последующем анализе. Так как при осаждении белков метанолом получены приемлемые

значения показателей MF и Recovery, способ ТФЭ в настоящем эксперименте не оценивался.

Таким образом, процесс пробоподготовки включал следующие операции: в пробирку типа «эппендорф» объемом 1,5 мл вносили 100 мкл экспериментального образца плазмы крови кроликов, стандартного образца, образца контроля качества или нулевой пробы; добавляли 400 мкл раствора IS в метаноле с добавлением 0,1%-й муравьиной кислоты (100 нг/мл), перемешивали на вортексе в течение 10 с и выдерживали в морозильнике при –28 °С в течение 15 мин для лучшего осаждения белков. После этого образцы центрифугировали в течение 15 мин при 15000g, 100 мкл супернатанта переноноси-

ли в полиэтиленовые вставки в хроматографические вials и использовали для последующего ВЭЖХ-МС/МС-анализа.

Концентрации BVP2023 и его метаболитов в образцах плазмы крови кроликов были рассчитаны по калибровочным кривым, построенным по площадям хроматографических пиков стандартных образцов аналитов в биоматериале, нормированных на площадь пика IS. Построение калибровочной кривой осуществлялось путем подбора простейшей модели, адекватно описывающей зависимость аналитического сигнала от концентрации, и использования подходящего нормирования.

Валидация биоаналитической методики

Селективность

Исследование селективности было проведено путем анализа холостых проб и проб с концентрацией BVP2023 и его метаболитов 5,0 нг/мл, приготовленных в 6 индивидуальных образцах интактной плазмы крови кроликов.

Результаты определения BVP2023 и его метаболитов в холостых образцах (k0) и в образцах LLOQ представлены в таблице 3. Пример хроматограммы холостого образца представлен на рисунке 4. Средние значения селективности составили 0,01 % для IS и менее 15 % для аналитов, что свидетельствует о способности методики дифференцировать BVP2023, его метаболиты и IS и эндогенные вещества матрицы и иные компоненты, содержащиеся в образце.

Таблица 3. Селективность определения BVP2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов

Table 3. Selectivity of determination of BVP2023 and its metabolites in rabbit blood plasma

Вещество Analyte	Площадь пика в образце k0 k0 sample peak area	Площадь пика в образце k5 k5 sample peak area	Селективность, % Selectivity, %
BVP2023	2420,0	18733,3	13,0
BVP2023 A	748,8	15250,0	4,9
BVP2023 C	5786,6	39616,7	14,6
Геранамин Geranamine	0,0	14250,0	0,0
IS	150,2	1283333,3	0,0

Эффект матрицы

Оценку влияния матричного эффекта на определение изучаемых веществ проводили для концентраций BVP2023, BVP2023 A, BVP2023 C 15 и 400 нг/мл (15 и 800 нг/мл для геранамин) в 6 индивидуальных образцах плазмы крови кроликов. Матричный

эффект рассчитывался как отношение сигнала аналита в неэкстрагированном образце (post-spike sample) к усредненному значению сигнала аналита в чистом растворителе (solvent-spike sample, $n = 6$).

Нормированный матричный фактор (NMF) рассчитывался как отношение нормированного на IS индивидуального значения площади пика аналита в плазме крови кроликов (post-spike sample) к усредненному значению отношения нормированного на IS значения площади пика аналита в стандартном растворе (solvent-spike sample).

Средние значения нормированного матричного фактора при анализе плазмы крови кроликов для BVP2023 и его метаболитов были приближены к 1 для низких (L) и высоких (H) концентраций (таблица 4). Приемлемые значения $CV < 15\%$ для NMF показывают, что используемый в качестве внутреннего стандарта 5-[(этоксикарбонил)имино]-3-(4-метилпентан-2-ил)-5H-1,2,3-оксадиазол-3-ий-2-ид эффективно компенсирует влияние матрицы на сигнал BVP2023 и его метаболитов и что присутствие матричных компонентов в индивидуальных образцах плазмы крови кроликов не будет отражаться на точности определения при анализе испытуемых биологических образцов.

Перенос пробы

Перенос вещества во время ВЭЖХ-МС/МС-анализа оценивали путем сравнения хроматограмм холостой пробы k0, анализируемой после 6-кратного ввода пробы с индивидуальной концентрацией веществ 800 нг/мл, и пробы с LLOQ (5 нг/мл) и рассчитывали как отношение сигнала в холостом образце к сигналу в образце LLOQ. Результаты представлены в таблице 5. Отклик детектора на BVP2023, его метаболиты и IS в холостых пробах был ниже максимально допустимого уровня (20 % для аналитов и 5 % для IS), что свидетельствует о незначительности переноса вещества при переходе от большей концентрации к меньшей.

Степень извлечения

Определение степени извлечения BVP2023 и его метаболитов проводили для концентраций BVP2023, BVP2023 A, BVP2023 C 15 и 400 нг/мл (15 и 800 нг/мл для геранамин) в 6 индивидуальных образцах плазмы крови кроликов. Степень извлечения была рассчитана как отношение сигнала в экстрагированном образце (pre-spike sample) к сигналу в неэкстрагированном образце (post-spike sample). Результаты определения степени извлечения представлены в таблице 6. Средние значения степени извлечения находятся в пределах 85–115 %, максимальный разброс (CV) не превышает 15 %, что свидетельствует о практически количественном извлечении анализируемых веществ.

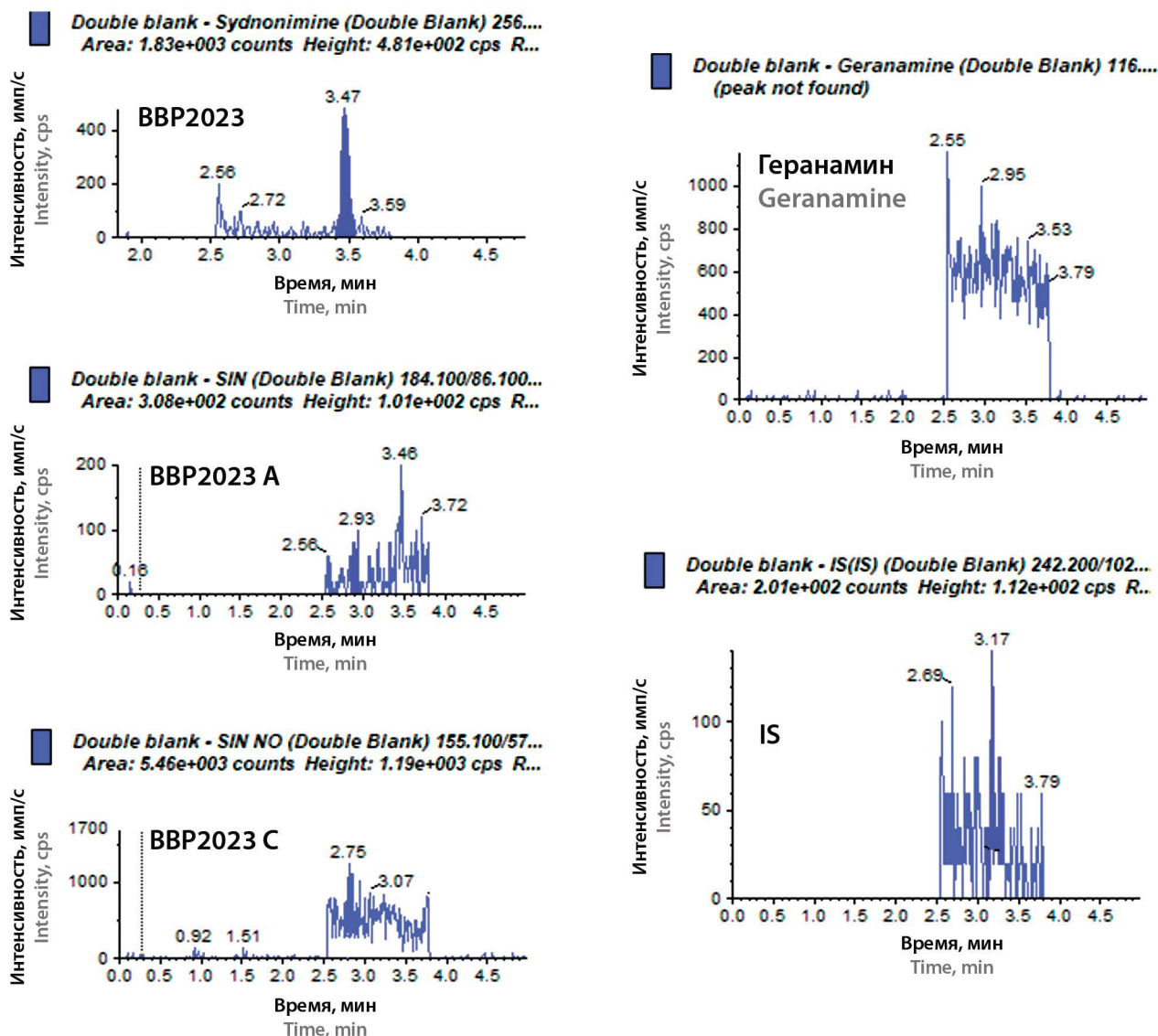


Рисунок 4. Фрагменты индивидуальных хроматограмм аналитов и внутреннего стандарта холостого образца плазмы крови кроликов

Figure 4. Fragments of individual chromatograms of analytes and the internal standard of a blank sample of rabbit blood plasma

Таблица 4. Эффект матрицы при определении BBP2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов

Table 4. Matrix effect in the determination of BBP2023 and its metabolites in rabbit plasma

Уровень Concentration level	Аналит Analyte	NMF						Среднее Mean	CV, %
L	BBP2023	0,85	0,82	0,87	0,81	1,01	0,82	0,86	8,82
	BBP2023 A	1,08	1,10	1,13	1,09	1,00	1,10	1,08	4,23
	BBP2023 C	0,99	0,98	1,02	1,05	1,03	0,99	1,01	2,76
	Геранамин Geranamine	1,17	1,12	1,15	1,17	1,00	1,15	1,13	5,81
H	BBP2023	0,87	0,90	0,96	0,96	0,90	0,92	0,93	3,16
	BBP2023 A	1,03	1,03	1,08	1,05	0,96	0,98	1,02	4,17
	BBP2023 C	1,01	1,09	1,19	1,02	0,98	1,06	1,06	7,06
	Геранамин Geranamine	1,13	1,11	1,13	1,15	1,06	1,15	1,12	3,07

Таблица 5. Оценка переноса пробы при определении ВВР2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов
Table 5. Estimation of sample carryover in the determination of ВВР2023 and its metabolites in rabbit blood plasma

Вещество Analyte	ВВР2023	ВВР2023 А	ВВР2023 С	Геранамин Geranamine	IS
Площадь пика в образце k5 k5 sample peak area	21700,0	14600,0	18100,0	27600,0	1400000,0
Площадь пика в образце k0 k0 sample peak area	876,0	838,0	0,0	0,0	297,0
Перенос пробы, % Carry-over, %	4,0	5,7	0,0	0,0	0,0

Таблица 6. Оценка степени извлечения ВВР2023 и его метаболитов из плазмы крови кроликов
Table 6. Estimation of the recovery of ВВР2023 and its metabolites in rabbit blood plasma

Уровень Concentration level	Вещество Analyte	ВВР2023	ВВР2023 А	ВВР2023 С	Геранамин Geranamine
L	Среднее, % Mean, %	98,9	101,2	94,9	87,3
	CV, %	9,6	5,3	6,0	8,3
H	Среднее, % Mean, %	89,3	94,2	92,8	101,4
	CV, %	12,7	6,7	12,7	6,1

Линейность калибровочного диапазона

Для выбора калибровочных диапазонов при определении ВВР2023 и его метаболитов образцы с концентрациями 1,0–4000,0 нг/мл (ожидаемый диапазон), а также нулевые пробы (с добавлением и без добавления IS) были приготовлены в плазме крови кроликов и проанализированы пятикратно в трех независимых сериях анализа. Построение калибровочных зависимостей проводилось с использованием ПО Analyst 1.6.3 (AB Sciex). Для построения калибровочных кривых по всем анализам использовали линейную регрессию с нормированием $1/x^2$, как простейшую модель, позволяющую описать зависимость нормированного сигнала от концентрации с соблюдением следующих критериев: коэффициент корреляции (r) > 0,995; точность определения калибровочного образца с концентрацией на уровне LLOQ лежит в диапазоне 80–120 %, остальных калибровочных образцов – в диапазоне 85–115 %. Нулевые пробы не были учтены при установлении зависимости.

По результатам анализа калибровочных образцов установлены следующие диапазоны линейности: 5,0–500,0 нг/мл для ВВР2023, ВВР2023 А и ВВР2023 С; 5,0–1000,0 нг/мл для геранамина. Отклонения от номинальной концентрации для не менее чем 75 % калибровочных образцов не превышали допустимые

значения (20 % для LLOQ и 15 % для остальных стандартов). Калибровочные графики, уравнения регрессии и коэффициенты корреляции валидационного цикла № 1 представлены на рисунке 5.

Точность и прецизионность

Определение внутри- и межсерийной точности и прецизионности определения ВВР2023 и его метаболитов проводили в трех независимых сериях путем анализа 5 контрольных образцов для 4 уровней концентрации – 5, 15, 200 и 400 нг/мл для ВВР2023, ВВР2023 А и ВВР2023 С (5, 15, 400 и 800 нг/мл для геранамина). Точность была определена как отношение рассчитанной концентрации в контрольном образце к номинальному значению, выраженное в процентах. Прецизионность определена как относительное стандартное отклонение (CV) между результатами определения аналита в контрольных образцах, выраженное в процентах. Критериями приемлемости считают: точность в диапазоне 80–120 %, прецизионность менее 20 % для концентрации на уровне LLOQ; точность в диапазоне 85–115 %, прецизионность менее 15 % для концентраций выше LLOQ. Полученные результаты показывают, что значения внутрисерийной и межсерийной (таблица 7) точности и прецизионности соответствуют вышеуказанным критериям.

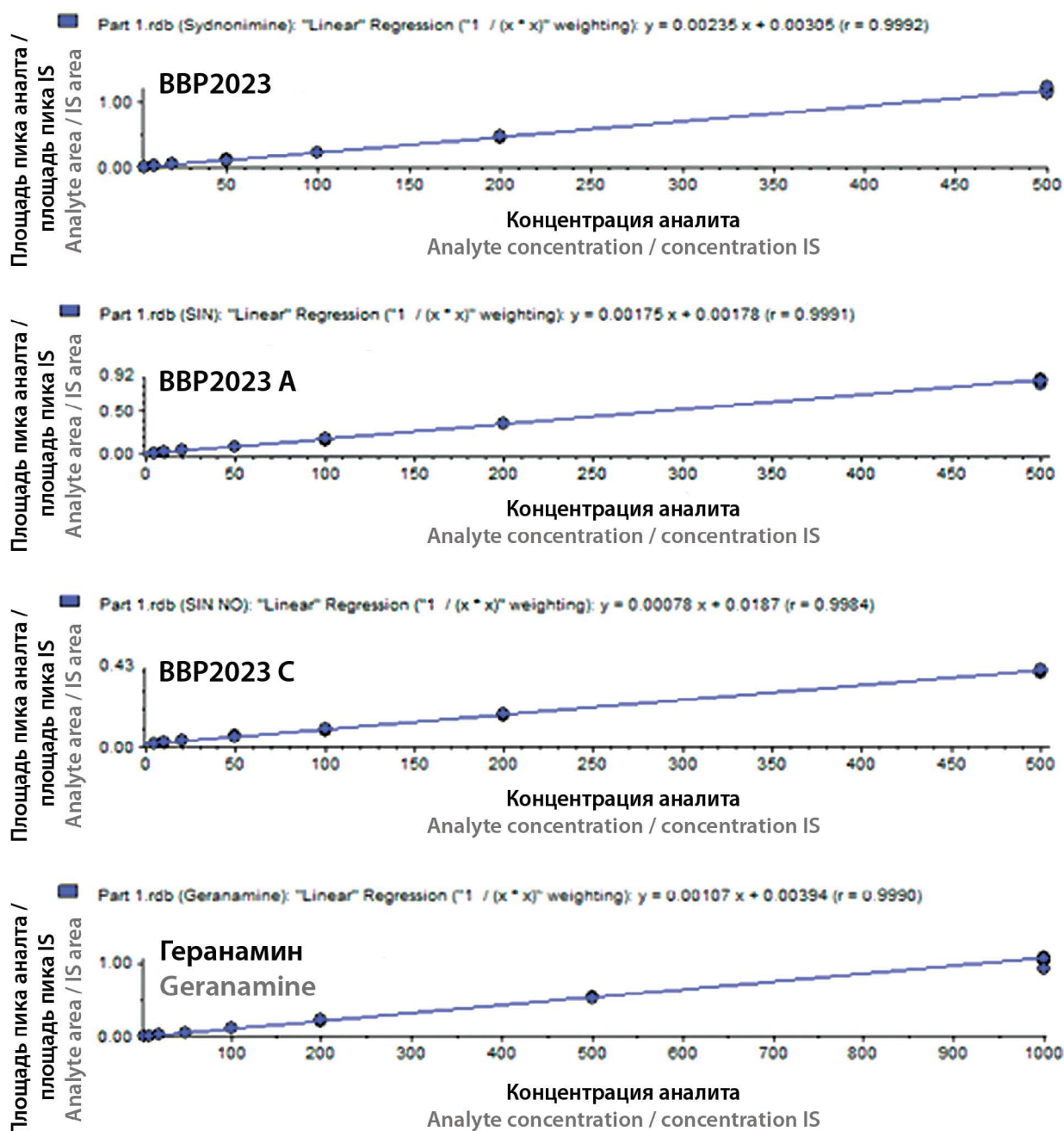


Рисунок 5. Калибровочные графики определения BVP2023 и его метаболитов валидационного цикла № 1

Figure 5. Calibration curves for the determination of BVP2023 and its metabolites from validation cycle 1

Нижний предел количественного определения

При анализе калибровочных образцов плазмы крови кроликов LLOQ для BVP2023 и его метаболитов установлен на уровне 5,0 нг/мл. При этом хроматографический сигнал соответствовал критериям приемлемости по точности и прецизионности, калибровочной кривой, соотношение «сигнал – шум» составило не менее 5. Запланированного LLOQ 1 нг/мл достичь не удалось. Фрагмент хроматограммы стандартного образца с содержанием аналитов на уровне НПКО представлен на рисунке 6.

Стабильность

Определение стабильности проводилось в соответствии с рекомендациями правил¹, были определены следующие виды стабильности BVP2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов: стабиль-

¹ 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: 17.10.2025

ность после 3 циклов заморозки/разморозки; краткосрочная стабильность; постпрепаративная стабильность; стабильность стандартных растворов аналитов и внутреннего стандарта в растворителе и долгосрочная стабильность. Критерием приемлемости в данном эксперименте является отклонение отклика на определяемое соединение по отношению к номинальному значению не более чем на 15 % (таблица 8).

Таблица 7. Межсерийная точность и прецизионность определения BBP2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов

Table 7. Inter-day accuracy and precision for the determination of BBP2023 and its metabolites in rabbit blood plasma

Уровень Concentration level	LLOQ	L	M	H
BBP2023				
Номинальная концентрация, нг/мл Nominal concentration, ng/ml	5,00	15,00	200,00	400,00
Среднее по трем сериям, нг/мл 3 series mean value, ng/ml	4,96	16,32	217,74	402,60
SD	0,17	0,46	2,33	13,24
Точность, % Accuracy, %	99,16	108,82	108,87	100,65
CV, %	3,34	2,83	1,07	3,29
BBP2023 A				
Номинальная концентрация, нг/мл Nominal concentration, ng/ml	5,00	15,00	200,00	400,00

Уровень Concentration level	LLOQ	L	M	H
Среднее по трем сериям, нг/мл 3 series mean value, ng/ml	4,90	16,56	213,93	380,83
SD	0,16	0,36	7,57	6,99
Точность, % Accuracy, %	98,08	110,42	106,97	95,21
CV, %	3,35	2,15	3,54	1,83
BBP2023 C				
Номинальная концентрация, нг/мл Nominal concentration, ng/ml	5,00	15,00	200,00	400,00
Среднее по трем сериям, нг/мл 3 series mean value, ng/ml	5,16	15,38	213,70	410,91
SD	0,14	0,30	7,74	18,23
Точность, % Accuracy, %	103,13	102,52	106,85	102,73
CV, %	2,64	1,97	3,62	4,44
Геранамин Geranamine				
Номинальная концентрация, нг/мл Nominal concentration, ng/ml	5,00	15,00	400,0	800,0
Среднее по трем сериям, нг/мл 3 series mean value, ng/ml	5,18	15,72	404,84	774,49
SD	0,04	0,43	10,55	20,87
Точность, % Accuracy, %	103,61	104,78	101,21	96,81
CV, %	0,86	2,72	2,61	2,70

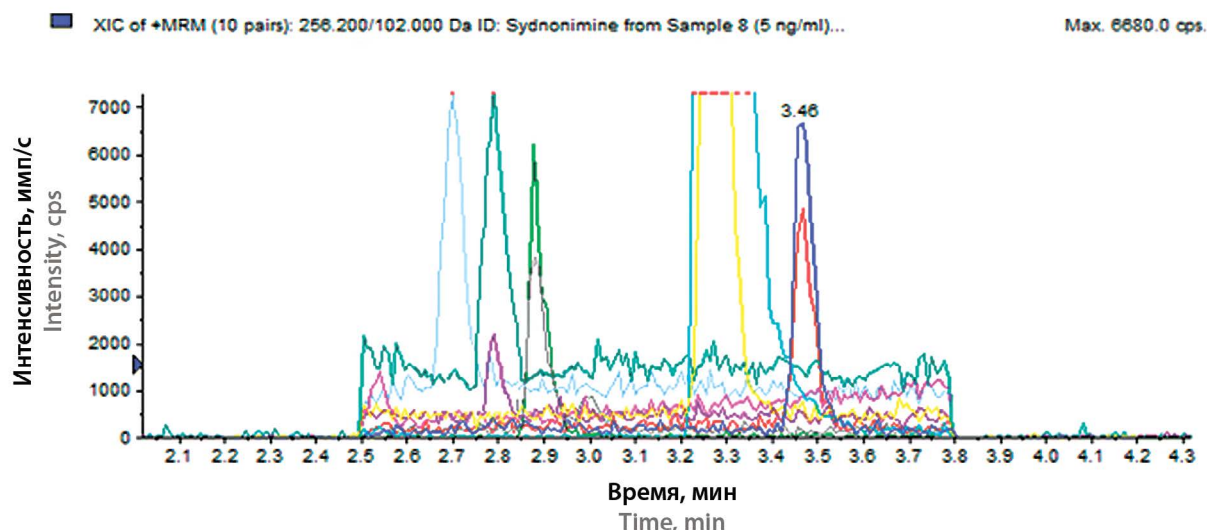


Рисунок 6. Фрагмент общей хроматограммы образца плазмы крови кроликов с содержанием аналитов на уровне нижнего предела количественного определения

Figure 6. Fragment of a general chromatogram of a rabbit blood plasma sample with analyte content at the lower limit of quantification

Таблица 8. Результаты оценки стабильности ВВР2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов

Table 8. Results of stability assessment of ВВР2023 and its metabolites in rabbit blood plasma

Вид стабильности Stability type	Стабильность, % Stability, %							
	ВВР2023		ВВР2023 А		ВВР2023 С		Геранамин Geranamine	
	L	H	L	H	L	H	L	H
Краткосрочная стабильность: хранение образцов при 20 ± 2 °С в течение 2 ч Short-term stability: samples stored at 20 ± 2 °C for 2 h	112,0	102,4	90,0	88,3	99,6	97,8	109,5	104,2
Постпрепаративная стабильность: хранение образцов при 20 ± 2 °С в течение 24 ч в автосамплере хроматографа Post-preparative stability: samples stored at 20 ± 2 °C for 24 h in autosampler	99,5	100,3	112,0	97,8	91,1	86,0	106,8	100,5
Стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки: не менее 72 ч при -40 ± 2 °С, не менее 2 ч при 20 ± 2 °С Stability after 3 cycles of freezing and thawing: not less than 72 h at -40 ± 2 °C, not less than 2 h at 20 ± 2 °C	111,6	108,7	88,4	93,4	91,2	97,6	106,4	99,2
Долгосрочная стабильность: 90 суток при -80 ± 2,5 °С Long-term stability: 90 days at -80 ± 2,5 °C	98,4	95,6	94,7	95,1	96,0	93,8	98,1	99,3
Стабильность исходных растворов: 60 суток при -40 ± 2 °С Stock solutions stability: 60 days at -40 ± 2 °C	101,2	100,4	98,8	97,5	95,6	97,1	100,9	102,0
Стабильность 10-кратных рабочих растворов: 60 суток при -40 ± 2 °С Tenfold work solution stability: 60 days at -40 ± 2 °C	96,8	96,1	97,4	96,8	94,9	97,5	95,4	99,1

Применение разработанной методики

Разработанная методика была использована при проведении аналитической части фармакокинетических исследований лекарственного кандидата ВВР2023 у кроликов, выполняемых в процессе реализации научно-исследовательской работы в рамках государственного задания (124020900020-4) «Разработка лекарственного кандидата, обладающего преимущественно центральным сосудорасширяющим действием для лечения цереброваскулярных патологий». С помощью данной биоаналитической методики были определены концентрации ВВР2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов после однократного внутривенного, внутривенного, внутримышечного и ректального введения АФС, а также после однократного и многократного введения ГЛС (мягкие желатиновые капсулы). Кроме того, данная методика была использована при исследовании линейности фармакокинетики ВВР2023 при внутривенном введении кроликам, а также явилась основой для разработки и валидации биоаналитической методики определения ВВР2023 и его метаболитов в органах и тканях крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения нового производного сиднонимина ВВР2023 и его метаболитов в плазме крови кроликов с применением ВЭЖХ-МС/МС [21]. Подтвержденные аналитические диапазоны для ВВР2023, ВВР2023 А и ВВР2023 С составили 5,0–500,0 нг/мл (5,0–1000,0 нг/мл для геранамин). Разработанная методика была использована при выполнении аналитической части исследования фармакокинетики лекарственного кандидата у кроликов при внутривенном, внутривенном, ректальном и внутримышечном путях введения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zivadinov R., Chung C.-P. Potential involvement of the extracranial venous system in central nervous system disorders and aging. *BMC Medicine*. 2013;11:260. DOI: 10.1186/1741-7015-11-260.

2. Kolmos M., Christoffersen L., Kruuse C. Recurrent ischemic stroke – a systematic review and meta-analysis. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2021;30(8):105935. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105935.

3. Ding R., Zhang H. Efficacy of very early mobilization in patients with acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Palliative Medicine*. 2021;10(11):11776–11784. DOI: 10.21037/apm-21-2997.
4. Shahid J., Kashif A., Shahid M. K. A comprehensive review of physical therapy interventions for stroke rehabilitation: impairment-based approaches and functional goals. *Brain Sciences*. 2023;13(5):717. DOI: 10.3390/brainsci13050717.
5. Yuan M., Xiao Z.-L., Zhou H.-Y., Rao W., Huang G., Nie H.-B., Cao W.-F., Xu R.-S. Bipolar disorder and the risk for stroke incidence and mortality: a meta-analysis. *Neurological Sciences*. 2022;43(1):467–476. DOI: 10.1007/s10072-021-05348-2.
6. Rajeev V., Chai Y. L., Poh L., Selvaraji S., Fann D. Y., Jo D.-G., De Silva T. M., Drummond G. R., Sobey C. G., Arumugam T. V., Chen C. P., Lai M. K. P. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment. *Acta Neuropathologica Communications*. 2023;11(1):93. DOI: 10.1186/s40478-023-01590-1.
7. Кулеш А. А., Емелин А. Ю., Боголепова А. Н., Дороница О. Б., Захаров В. В., Колоколов О. В., Котов С. В., Корсунская Л. Л., Кутлубаев М. А., Ласков В. Б., Левин О. С., Парфенов В. А. Клинические проявления и вопросы диагностики хронического цереброваскулярного заболевания (хронической ишемии головного мозга) на ранней (додементной) стадии. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2021;13(1):4–12. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1-4-12.
8. Rajeev V., Fann D. Y., Dinh Q. N., Kim H. A., De Silva T. M., Lai M. K. P., Chen C. L.-H., Drummond G. R., Sobey C. G., Arumugam T. V. Pathophysiology of blood brain barrier dysfunction during chronic cerebral hypoperfusion in vascular cognitive impairment. *Theranostics*. 2022;12(4):1639–1658. DOI: 10.7150/thno.68304.
9. Cross J. G., May B. R., Mai P. Q. M., Anderson E., Welsh C., Chandran S., Chorath K. T., Herr S., Gonzalez D. A systematic review and evaluation of post-stroke depression clinical practice guidelines. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2023;32(9):107292. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.107292.
10. Castello J. P., Pasi M., Kubiszewski P., Abramson J. R., Charidimou A., Kourkoulis C., DiPucchio Z., Schwab K., Anderson C. D., Gurol M. E., Greenberg S. M., Rosand J., Viswanathan A., Biffi A. Cerebral small vessel disease and depression among intracerebral hemorrhage survivors. *Stroke*. 2022;53(2):523–531. DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.035488.
11. Ištoňová M., Dorko E., Knap V., Stehlíková B., Murgová A., Ondová P., Rimárová K. Assessment of depressive disorders and states of anxiety in patients following cerebrovascular accidents in connection with health care provision. *Central European Journal of Public Health*. 2024;32(Suppl):S18–S24. DOI: 10.21101/cejph.a7888.
12. Ghosh P. A., Chaudhury S., Rohatgi S. Assessment of Depression, Anxiety, Stress, Quality of Life, and Fatigue in Patients After a Cerebrovascular Accident. *Cureus*. 2024;16(10):e72051. DOI: 10.7759/cureus.72051.
13. McAleese N., Guzman A., O'Rourke S. J., Gillespie D. C. Post-stroke emotionalism: a qualitative investigation. *Disability and Rehabilitation*. 2021;43(2):192–200. DOI: 10.1080/09638288.2019.1620876.
14. Wu J., Yin W., Huang Z., Zhang Y., Jia J., Cheng H., Kang F., Huang K., Sun T., Tian J., Xu X., Zhang Y. Design, synthesis, and biological evaluation of organic nitrite (NO₂⁻) donors as potential anticerebral ischemia agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;64(15):10919–10933. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00282.
15. Archavlis E., Nievas M. C. Y. Cerebral vasospasm: a review of current developments in drug therapy and research. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*. 2013;2(1):18. DOI: 10.7243/2050-120X-2-18.
16. Idocin A. F., Specklin S., Taran F. Sydnonimines: synthesis, properties and applications in chemical biology. *Chemical Communications*. 2025;61(31):5704–5718. DOI: 10.1039/d5cc00535c.
17. Попов Н. С., Баранов М. С., Балабаньян В. Ю. Целенаправленное изучение фармакокинетики соединений-лидеров из группы сиднониминов как основа для создания вазодилаторов с преимущественно центральным действием. *Трансляционная медицина*. 2024;11(S2):112.
18. Docherty J. R., Alsufyani H. A. Pharmacology of drugs used as stimulants. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2021;61:S53–S69. DOI: 10.1002/jcph.1918.
19. Popov N. S., Gavrilenko D. A., Pavlov R. D., Baranov M. S., Kaurova D. E., Myasnyanko I. N., Ivanov D. S., Balabanyan V. Y. Study of the biotransformation of a new sydnonimine derivative with predominant cerebral vasodilatory activity. *Research Results in Pharmacology*. 2025;11(4):258–271. DOI: 10.18413/rrpharmacology.11.1042.
20. Попов Н. С., Терехов В. М., Баранов М. С., Балабаньян В. Ю., Каурова Д. Е., Мяснянко И. Н. и др. Оценка роли печеночного метаболизма в биотрансформации сиднониминов *in vivo*. *Вестник РГМУ*. 2025;(3):50–57. DOI: 10.24075/vrgmu.2025.026.
21. Попов Н. С., Гавриленко Д. А., Баранов М. С., Каурова Д. Е., Мяснянко И. Н., Балабаньян В. Ю. Исследование фармакокинетики нового производного сиднонимина у кроликов при различных путях введения. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2025;(4):69–76. DOI: 10.37489/2587-7836-2025-4-69-76.

REFERENCES

1. Zivadnov R., Chung C.-P. Potential involvement of the extracranial venous system in central nervous system disorders and aging. *BMC Medicine*. 2013;11:260. DOI: 10.1186/1741-7015-11-260.
2. Kolmos M., Christoffersen L., Kruuse C. Recurrent ischemic stroke – a systematic review and meta-analysis. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2021;30(8):105935. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105935.
3. Ding R., Zhang H. Efficacy of very early mobilization in patients with acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Palliative Medicine*. 2021;10(11):11776–11784. DOI: 10.21037/apm-21-2997.
4. Shahid J., Kashif A., Shahid M. K. A comprehensive review of physical therapy interventions for stroke rehabilitation: impairment-based approaches and functional goals. *Brain Sciences*. 2023;13(5):717. DOI: 10.3390/brainsci13050717.
5. Yuan M., Xiao Z.-L., Zhou H.-Y., Rao W., Huang G., Nie H.-B., Cao W.-F., Xu R.-S. Bipolar disorder and the risk for stroke incidence and mortality: a meta-analysis. *Neurological Sciences*. 2022;43(1):467–476. DOI: 10.1007/s10072-021-05348-2.

6. Rajeev V., Chai Y.L., Poh L., Selvaraji S., Fann D.Y., Jo D.-G., De Silva T.M., Drummond G.R., Sobey C.G., Arumugam T.V., Chen C.P., Lai M.K.P. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment. *Acta Neuropathologica Communications*. 2023;11(1):93. DOI: 10.1186/s40478-023-01590-1.
7. Kulesh A.A., Emelin A.Yu., Bogolepova A.N., Doronina O.B., Zakharov V.V., Kolokolov O.V., Kotov S.V., Korsunskaya L.L., Kutlubaev M.A., Laskov V.B., Levin O.S., Parfenov V.A. Clinical manifestations and issues of diagnosis of chronic cerebrovascular disease (chronic cerebral ischemia) at an early (pre-dementia) stage. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2021;13(1):4–12. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1-4-12.
8. Rajeev V., Fann D.Y., Dinh Q.N., Kim H.A., De Silva T.M., Lai M.K.P., Chen C.L.-H., Drummond G.R., Sobey C.G., Arumugam T.V. Pathophysiology of blood brain barrier dysfunction during chronic cerebral hypoperfusion in vascular cognitive impairment. *Theranostics*. 2022;12(4):1639–1658. DOI: 10.7150/thno.68304.
9. Cross J.G., May B.R., Mai P.Q.M., Anderson E., Welsh C., Chandran S., Chorath K.T., Herr S., Gonzalez D. A systematic review and evaluation of post-stroke depression clinical practice guidelines. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2023;32(9):107292. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.107292.
10. Castello J.P., Pasi M., Kubiszewski P., Abramson J.R., Charidimou A., Kourkoulis C., DiPucchio Z., Schwab K., Anderson C.D., Gurol M.E., Greenberg S.M., Rosand J., Viswanathan A., Biffi A. Cerebral small vessel disease and depression among intracerebral hemorrhage survivors. *Stroke*. 2022;53(2):523–531. DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.035488.
11. Ištoňová M., Dorko E., Knap V., Stehlíková B., Murgová A., Ondová P., Rimárová K. Assessment of depressive disorders and states of anxiety in patients following cerebrovascular accidents in connection with health care provision. *Central European Journal of Public Health*. 2024;32(Suppl):S18–S24. DOI: 10.21101/cejph.a7888.
12. Ghosh P.A., Chaudhury S., Rohatgi S. Assessment of Depression, Anxiety, Stress, Quality of Life, and Fatigue in Patients After a Cerebrovascular Accident. *Cureus*. 2024;16(10):e72051. DOI: 10.7759/cureus.72051.
13. McAleese N., Guzman A., O'Rourke S.J., Gillespie D.C. Post-stroke emotionalism: a qualitative investigation. *Disability and Rehabilitation*. 2021;43(2):192–200. DOI: 10.1080/09638288.2019.1620876.
14. Wu J., Yin W., Huang Z., Zhang Y., Jia J., Cheng H., Kang F., Huang K., Sun T., Tian J., Xu X., Zhang Y. Design, synthesis, and biological evaluation of organic nitrite (NO_2^-) donors as potential anticerebral ischemia agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;64(15):10919–10933. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00282.
15. Archavlis E., Nieves M.C.Y. Cerebral vasospasm: a review of current developments in drug therapy and research. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*. 2013;2(1):18. DOI: 10.7243/2050-120X-2-18.
16. Idocin A.F., Specklin S., Taran F. Sydnonimines: synthesis, properties and applications in chemical biology. *Chemical Communications*. 2025;61(31):5704–5718. DOI: 10.1039/d5cc00535c.
17. Popov N.S., Baranov M.S., Balabanyan V.Yu. Targeted study of the pharmacokinetics of the leading compounds from the group of sydnonymines as a basis for the creation of vasodilators with predominantly central action. *Translational medicine*. 2024;11(S2):112. (In Russ.)
18. Docherty J.R., Alsufyani H.A. Pharmacology of drugs used as stimulants. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2021;61:S53–S69. DOI: 10.1002/jcph.1918.
19. Popov N.S., Gavrilenko D.A., Pavlov R.D., Baranov M.S., Kaurova D.E., Myasnyanko I.N., Ivanov D.S., Balabanyan V.Yu. Study of the biotransformation of a new sydnimine derivative with predominant cerebral vasodilatory activity. *Research Results in Pharmacology*. 2025;11(4):258–271. DOI: 10.18413/rrpharmacology.11.1042.
20. Popov N.S., Terekhov V.M., Baranov M.S., Balabanyan V.Yu., Kaurova D.E., Myasnyanko I.N., et al. *In vivo* assessment of the role of liver metabolism in sydnimine biotransformation. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2025;(3):50–57. (In Russ.) DOI: 10.24075/vrgmu.2025.026.
21. Popov N.S., Gavrilenko D.A., Baranov M.S., Kaurova D.E., Myasnyanko I.N., Balabanyan V.Yu. Study of the pharmacokinetics of a new sydnimine derivative in rabbits with various routes of administration. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2025;(4):69–76. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2025-4-69-76.