

УДК 615.214:615.034:543.544.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНОГО 3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-ОНА В МОЧЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ЭКСКРЕЦИИ ИЗ ОРГАНИЗМА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко, Т.И. Ярыгина

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Минздрава России, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2
E-mail: bulgakova_pfa@mail.ru

Известно, что практически любое заболевание со стороны центральной нервной системы сопровождается развитием когнитивных расстройств. Препаратами выбора в составе комплексной терапии в данном случае являются ноотропы. На мировом рынке среди ноотропных препаратов преобладает группа рацетамов (производных альфа-пирролидона), характеризующаяся широким спектром фармакологической активности. В настоящее время данная группа продолжает расширяться. Сотрудниками Пермской государственной фармацевтической академии под руководством профессора Гейна В.Л. было синтезировано новое биологически активное соединение, производное 3-гидрокси-3-пирролин-2-она – КОН-1, которое сейчас проходит этап доклинических исследований. **Целью** настоящей работы явилась разработка методики определения КОН-1 в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также изучение экскреции КОН-1 из организма лабораторных животных. **Материалы и методы.** Исследования по разработке методики проводили с использованием жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодноматричным детектором. Валидацию осуществляли в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам, по показателям селективность, линейность, прецизионность и правильность. Экскрецию КОН-1 изучали на белых нелинейных крысах массой 300–400 г после однократного перорального введения в дозе 100 мг/кг. **Результаты и обсуждение.** В результате исследований разработана методика определения биологически активного соединения КОН-1 в моче. Проведенная валидация показала ее пригодность для фармакокинетических исследований. Получены данные по суточному выведению КОН-1 с мочой после однократного перорального введения крысам. **Заключение.** Разработанные условия хроматографического определения КОН-1 в моче могут быть использованы при фармакокинетических исследованиях, как на доклиническом, так и клиническом этапах изучения потенциального лекарственного средства. Данные по экскреции КОН-1 позволят определить пути выведения препарата, а также подобрать рациональную дозировку, выявить возможные противопоказания к применению.

Ключевые слова: ноотропы, КОН-1, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, фармакокинетика

DETERMINATION OF 3-HYDROXY-3-PYRROLINE-2-ONE IN URINE AND STUDY OF ITS EXCRETION FROM THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS

E.A. Bulgakova, Yu.N. Karpenko, T.I. Yarygina

Perm State Pharmaceutical Academy
2, Poleyaya st., Perm, Russia, 614990
E-mail: bulgakova_pfa@mail.ru

It is known that almost any disease of the central nervous system is accompanied by the development of cognitive disorders. The drugs of choice in the complex therapy in this case are nootropics. On the world market racetam group, i.e. derivatives of alpha-pyrrolidone, prevails among nootropics, and the derivatives have a wide spectrum of pharma-

Для цитирования:

Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНОГО
3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-ОНА В МОЧЕ
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ЭКСКРЕЦИИ ИЗ ОРГАНИЗМА
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.
Фармация и фармакология. 2017;5(4):331-343.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-4-331-343

© Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И., 2017.

For citation:

Bulgakova E.A., Karpenko Yu.N., Yarygina T.I.
DETERMINATION
OF 3-HYDROXY-3-PYRROLINE-2-ONE IN URINE
AND STUDY OF ITS EXCRETION
FROM THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(4):331-343. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-4-331-343

cological activity. Currently, this group continues to expand. By the employees of Perm State Pharmaceutical Academy (PSPA), ruled by Professor V.L. Gein, a new biologically active compound, a 3-pyrrolin-2-one derivative - KOH-1 was synthesized. This compound is at the preclinical research stage now. **The aim** of this work was the development of methods for determination of KOH-1 in urine by high performance liquid chromatography (HPLC), the study of excretion KOH-1 from the organism of laboratory animals. **Materials and methods.** Studies on the development of methods were carried out by using a liquid chromatograph LC-20 Prominence (Shimadzu, Japan) with a diode-array detector. The validation was carried out in accordance with the requirements for bioanalytical methods, in terms of selectivity, linearity, precision and accuracy. The study of excretion of KOH-1 was performed on white non-linear male rats weighing 300-400 g. The substance KOH-1 was administered once orally in a suspension of starch mucus at a dose of 100 mg/kg. **Results and discussion.** As a result of the research, the method for determining the biologically active compound KOH-1 in urine has been developed. The validation showed its suitability for pharmacokinetic studies. The data on daily excretion of KOH-1 in urine after a single oral administration to rats were obtained. **Conclusion.** The developed conditions for the chromatographic determination of KOH-1 in urine can be used in pharmacokinetic studies, both at the preclinical and clinical stages of the study of a potential drug. The data on excretion of KOH-1 will allow to determine the ways of excretion of the preparation, and also to select a rational dosage, to identify possible contraindications to the use.

Keywords: nootropics, KOH-1, high-performance liquid chromatography, validation, pharmacokinetics

Введение. Известно, что практически любое заболевание со стороны центральной нервной системы сопровождается развитием когнитивных расстройств, которые проявляются в снижении памяти, внимания и умственной работоспособности. Когнитивные расстройства негативно сказываются на качестве жизни пациента и нуждаются в коррекции [1]. Препаратами выбора в составе комплексной терапии в данном случае являются ноотропы. В настоящее время они являются единственной группой фармакологических средств с выраженным нейрометаболическим действием. На мировом рынке среди но-

отропных препаратов преобладает группа рацетамов (производных альфа-пирролидона), характеризующаяся широким спектром фармакологической активности. В настоящее время данная группа продолжает расширяться. Сотрудниками Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА) под руководством профессора Гейна В.Л. было синтезировано новое биологически активное соединение [2], производное 3-пирролин-2-она – КОН-1 (рис. 1), обладающее выраженным антиамнестическим действием. Сейчас соединение проходит стадию доклинических исследований.

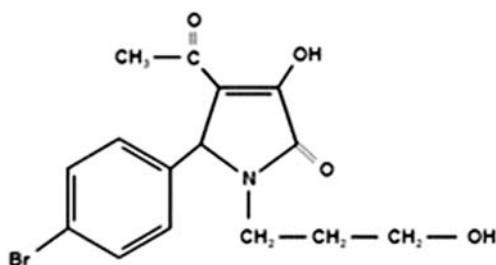


Рисунок 1 – Структурная формула КОН-1
(4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он)

Внедрение современных препаратов в клиническую практику осуществимо лишь при условии детальной оценки их специфической фармакологической активности и безопасности на стадии экспериментальных (доклинических) исследований. Целью доклинических фармакокинетических исследований является изучение поведения потенциальных лекарств в организме лабораторных животных, а именно процессов всасывания, распределения, метаболизма и выведения [3]. Изучение экскреции – важный этап доклиники, который позволяет оценить скорость элиминации потенциальных лекарств. В связи с этим, актуальными являются исследования по разработке высокочувствительных методик определения биологически активных соединений в биологических жидкостях, в частности в моче.

При фармакокинетических исследованиях ноотропных препаратов из группы рацетамов используются методы газожидкостной хроматографии [4], высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим [5] и масс-селективным детектированием [6-12]. Выбор способа пробоподготовки мочи к анализу зависит от физико-химических свойств лекарственного вещества. Так, при фармакокинетических исследованиях ноотропных препаратов при анализе мочи используют пробоподготовку на основе жидкость-жидкостной экстракции [13, 14, 15] и простое разбавление образца водой [16]. Ранее проведенные исследования показали, что КОН-1 эффективно экстрагируется из мочи при pH 3 хлороформом (более 98%) [17].

Целью нашей работы явилась разработка мето-

дики определения КОН-1 в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также изучение экскреции КОН-1 из организма лабораторных животных.

Материалы и методы. В работе использовали субстанцию КОН-1, синтезированную в ПГФА и соответствующую требованиям проекта ФСП [18], а также следующие реагенты: ацетонитрил (*HPLC grade, Merck*), хлористоводородная кислота разведенная 8,3%, калия дигидрофосфат (х.ч.), хлороформ (х.ч.). Вода для приготовления элюентов была получена с помощью системы очистки воды *Simplicity UV (Millipore, Merck)*.

Исследования по разработке методики проводили с использованием *жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором. Хроматографическая колонка: Luna 5uC18(2) 100A (250×4,6 мм, Phenomenex)*. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и фосфатного буфера (pH 7). Детектирование проводили при длине волны 324 нм.

Пробоподготовку мочи осуществляли методом жидкость-жидкостной экстракции хлороформом. Для этого в пробирку типа Эппендорф помещали 1 мл модельной смеси, подкисляли кислотой хлористоводородной разведенной 8,3 % до pH 3 по универсальному индикатору (50 мкл). Далее проводили двукратную экстракцию хлороформом порциями по 0,5 мл, используя пробирочный вортекс. Время каждой экстракции – 1 минута. Образовавшуюся эмульсию разрушали путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 5 мин. Органический слой переносили в выпарительную чашку, сухой остаток после удаления экстрагента в токе теплого воздуха растворяли в 1 мл метанола. Извлечения фильтровали через мем-

бранные шприцевые нейлоновые фильтры с размером пор 0,45 мкм [17].

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам, по показателям селективность, линейность, прецизионность и правильность [19, 20, 21].

Исследование экскреции КОН-1 проводили на белых нелинейных крысах-самцах массой 300–400 г, полученных из вивария ПГФА. Субстанцию КОН-1 вводили однократно перорально в суспензии крахмальной слизи в дозе 100 мг/кг. Сбор экскретов осуществляли в метаболических клетках в течение 24 часов после введения КОН-1.

Результаты и обсуждение. Условия хроматографирования и детектирования. Ранее проведенные исследования показали эффективность использования элюента на основе ацетонитрила и фосфатного буфера (pH 7) для анализа производных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она [22]. В данной подвижной фазе максимум поглощения КОН-1 составляет 324 нм (рис. 2), что обеспечивает высокую селективность его определения при анализе таких сложных многокомпонентных образцов, как извлечения из биологических объектов. Установлено, что время удерживания исследуемого вещества сильно зависит от концентрации фосфатного буфера (pH 7) в составе элюента. Увеличение буферного раствора в элюенте с 60 до 80 % приводит к увеличению времени удерживания с 3 до 11 минут. Смесь фосфатного буфера (pH 7) и ацетонитрила в соотношении 75:25 при потоке 1 мл/мин обеспечила приемлемый коэффициент удерживания КОН-1, хорошее разделение с соседними хроматографическими пиками, и далее использовалась в качестве подвижной фазы. Время удерживания КОН-1 в данных условиях составило 5,5 мин.

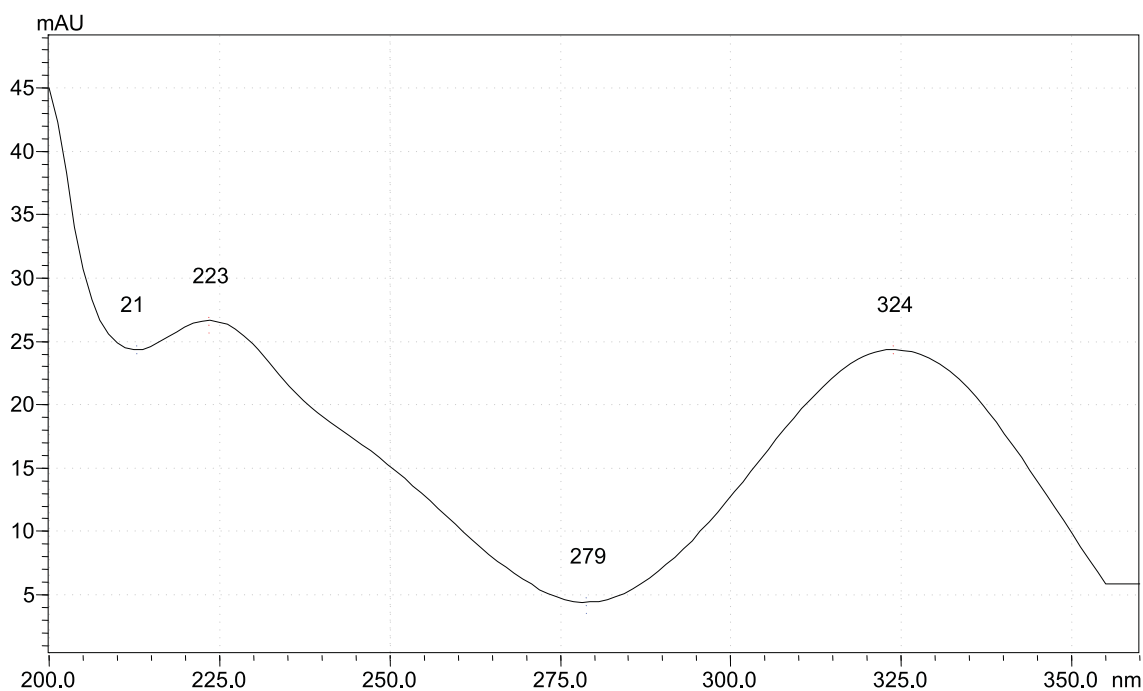


Рисунок 2 – УФ-спектр КОН-1 в подвижной фазе

Валидация методики. Валидация разработанной методики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ-УФ проведена по показателям селективность, линейность, прецизионность и правильность в соответствии с предъявляемыми требованиями [19, 20, 21].

Селективность методики была установлена пу-

тем анализа извлечений из «холостых» образцов мочи, а также модельных смесей мочи с концентрацией КОН-1 на уровне 20 мкг/мл. На хроматограммах извлечений из холостого образца не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания КОН-1, что свидетельствует о селективности методики (рис. 3-4).

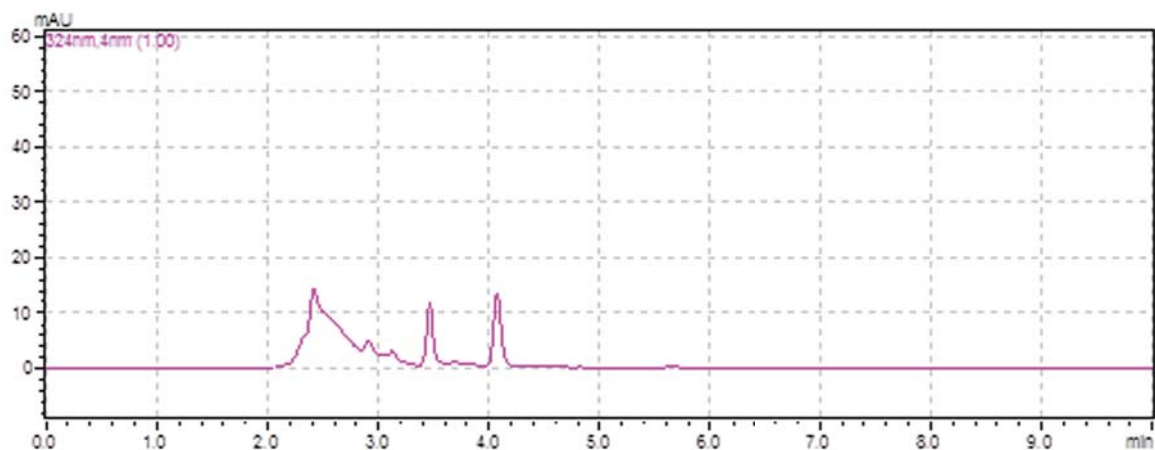


Рисунок 3 – Хроматограмма извлечения из «холостой» пробы мочи

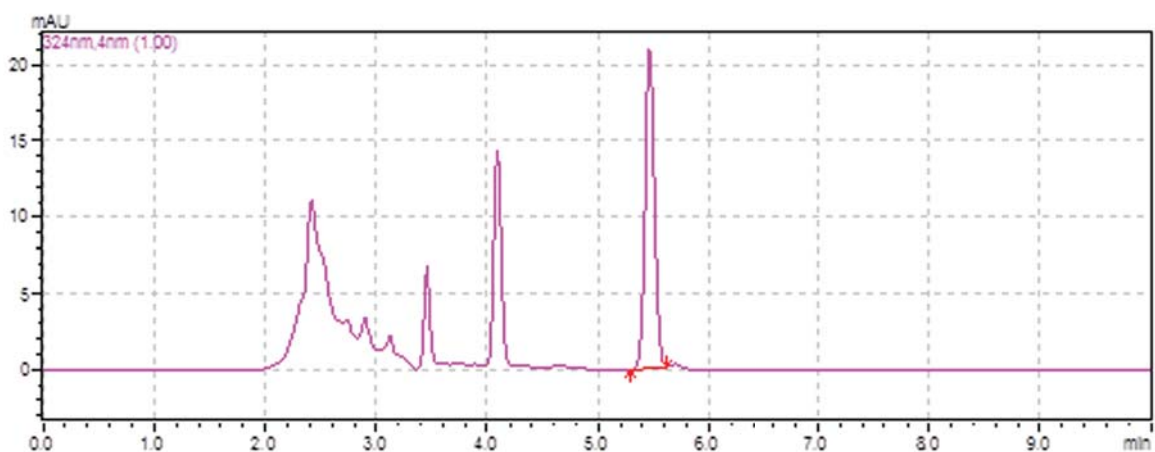


Рисунок 4 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси мочи с концентрацией КОН-1 (20 мкг/мл)

При оценке линейности методики были приготовлены и проанализированы 8 модельных растворов мочи (калибровочных стандартов) с концентрацией КОН-1 в диапазоне от 0,5 до 125 мкг/мл. Уравнение калибровочного графика имеет вид $Y = 2189 \cdot X$. Коэффициент корреляции составил 0,99865, что под-

тверждает линейность методики в указанном диапазоне.

Калибровочный график представлен на рисунке 5. В таблице 1 представлены результаты обратного перерасчета концентраций калибровочных стандартов, полученных с использованием калибровочного графика.

Таблица 1 - Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

$C_{\text{факт.}}$	0,69	2,09	7,79	25,1	50,2	83,3	100,4	125,5
$C_{\text{рассчит.}}$	0,63	2,15	7,84	22,97	48,23	81,46	100,86	128,84
$\epsilon, \%$	-8,7	2,87	5,0	-8,48	-3,92	-2,2	0,46	2,66
Норма	Не более 20%	Не более 15%						

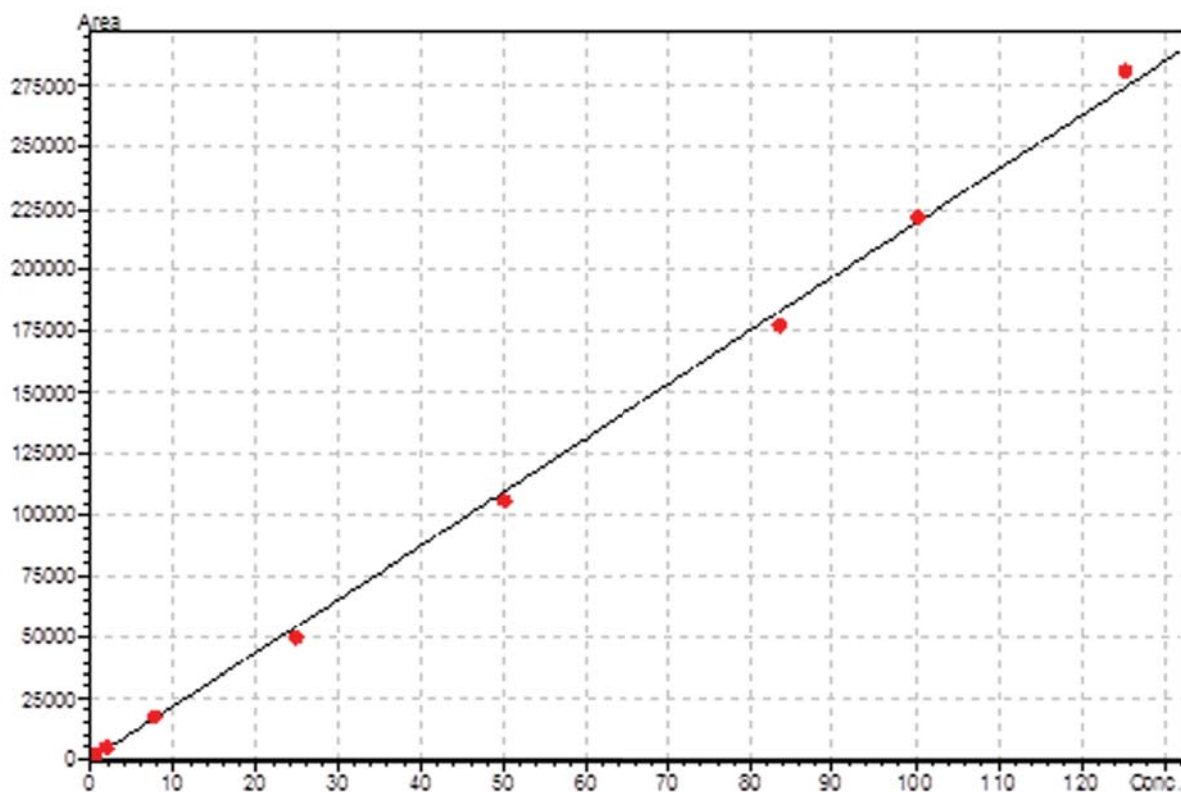


Рисунок 5 – Калибровочный график количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ

Экспериментально рассчитанные концентрации калибровочных стандартов не превышают пределов $\pm 15\%$ от номинальных, что соответствует критериям приемлемости [19, 20, 21].

6 модельных биообразцов (образцов контроля качества) на 5 уровнях концентраций КОН-1: 0,56; 3,36; 16,80; 62,75 и 111,56 мкг/мл были приготовлены для подтверждения пригодности методики по

параметрам прецизионность и правильность. Подготовку образцов для анализа осуществляли в соответствии с описанной методикой. Прецизионность и правильность методики оценивали по величинам относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (δ , %) соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Метрологические характеристики количественного определения КОН-1 в моче методом ВЭЖХ

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, мкг/мл	Найденная концентрация, мкг/мл	\bar{X} (n = 6)	SD	RSD, %	δ , %
0,56	0,64; 0,58; 0,66; 0,53; 0,62; 0,57	0,60	0,0467	7,7817	7,14
3,36	3,12; 3,41; 3,90; 3,75; 4,01; 3,24	3,57	0,3352	9,3857	6,25
16,80	16,87; 16,95; 17,42; 16,84; 17,69; 18,06	17,31	0,3723	2,1512	3,04
62,75	55,51; 57,65; 58,47; 56,54; 59,57; 58,79	57,76	1,4375	2,4890	-7,95
111,56	98,57; 101,98; 102,53; 109,33; 100,05; 104,1	102,76	3,7075	3,6079	-7,89

Полученные результаты контроля не превышают 15%, допускаемых для биоаналитических методик, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических ошибок в результатах анализа [19, 20, 21].

Фармакокинетические исследования. Разработанная методика была использована при проведении доклинических фармакокинетических исследований по экскреции КОН-1 на лабораторных животных. Эксперимент на животных осуществлялся в соответствии

с правовыми нормами использования животных при проведении доклинических исследований [23].

Опыт проводили на белых нелинейных крысах-самцах массой 300-400 г, полученных из вивария Пермской фармацевтической академии. Животные содержались в стационарных условиях при естественном световом режиме на стандартном рационе.

За 20 ч до начала эксперимента животных лишали пищи. Субстанцию КОН-1 вводили однократно перорально в суспензии крахмальной слизи в дозе 100 мг/кг. Сбор экскретов осуществляли в метаболических клетках в течение 24 часов после введения КОН-1. Результаты количественного анализа КОН-1 в образцах мочи представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Суточное содержание КОН-1 в моче крыс после однократного перорального введения в дозе 100 мг/кг

Масса крысы, г	Объем мочи, мл	Обнаруженная концентрация, мкг/мл	% от введенной дозы
320,0	17	94,75	5,0
400,0	19	60,23	2,9
370,0	21	83,58	4,9
340,0	14	141,83	5,9
350,0	17	87,08	4,2
340,0	24	67,87	4,7
			$\bar{X} = 4,6\%$ SD = 1,0

Такими образом, проведенные исследования показали, что после однократного перорального введения крысам субстанции КОН-1 в дозе 100 мг/кг, с мочой за сутки в среднем выводится около 5 % вещества в неизменном виде.

Закключение. Разработана методика количественного определения КОН-1 в моче, включающая в себя жидкость-жидкостную экстракцию аналита с последующим его определением методом ВЭЖХ/

УФ. Путем валидационной оценки установлена селективность, линейность, правильность и прецизионность методики. Методика успешно использована в фармакокинетических исследованиях при изучении экскреции КОН-1 с мочой на лабораторных животных. Показано, что после однократного перорального введения крысам субстанции КОН-1 в дозе 100 мг/кг с мочой за сутки в среднем выводится около 5% вещества в неизменном виде.

Introduction. It is known that almost any disease of the central nervous system is accompanied by the development of cognitive disorders, which are manifested by decrease in memory, attention and mental performance. Cognitive disorders adversely affect the quality of life of the patient and need correction [1]. The drugs of choice in the complex therapy in this case are nootropics. Currently, they are the only group of pharmacological agents with a pronounced neurometabolic effect. On the world

market racetam group, i.e. derivatives of alpha-pyrrolidone, prevails among nootropics, and these derivatives have a wide spectrum of pharmacological activity. Currently, this group continues to expand. By the employees of Perm State Pharmaceutical Academy (PSPA), ruled by Professor V.L. Gein, a new biologically active compound [2], a 3-pyrrolin-2-one derivative – КОН-1 (Fig. 1) was synthesized.

This compound is at the preclinical research stage now.

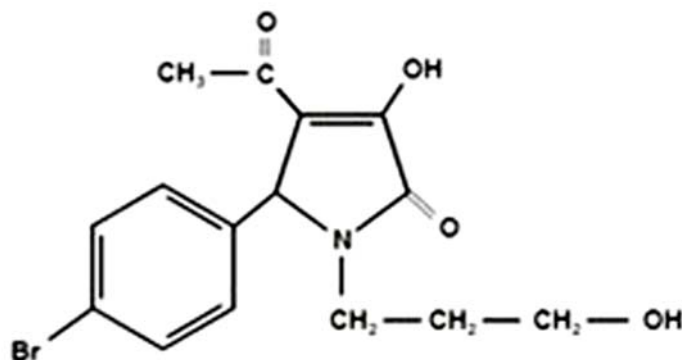


Figure 1 – Structural formula КОН-1
(4-acetyl-5-(4-bromophenyl)-3-hydroxy-1-(3-hydroxypropyl)-3-pyrrolin-2-one)

The introduction of modern drugs into clinical practice is feasible only when studying a detailed assessment of their specific pharmacological activity and safety at the stage of experimental (preclinical) studies. The purpose of preclinical pharmacokinetic studies is to study the behavior of potential drugs in the body of laboratory animals, i.e. the processes of absorption, distribution, metabolism and excretion [3]. The study of excretion is an important stage of the preclinical, which allows estimating the rate of elimination of potential drugs. In this connection, studies on the development of highly sensitive methods for the determination of biologically active compounds in biological fluids, particularly in urine, are relevant.

While pharmacokinetic studying nootropics racetam group, methods of gas liquid chromatography [4], high performance liquid chromatography with fluorimetric [5] and mass selective detection [6-12] are used. The choice of the method of urine preparation for the analysis depends on the physico-chemical properties of the drug substance. Thus, for pharmacokinetic studies of nootropic drugs, urine sample is analysed on the basis of liquid-liquid extraction [13, 14, 15] and simple dilution of the sample with water [16]. The previous studies have shown that KOH-1 is effectively extracted from urine at pH 3 by chloroform (more than 98%) [17].

The aim of this work was working out methods for determination of KOH-1 in urine by high performance liquid chromatography (HPLC), the study of excretion of KOH-1 from the organism of laboratory animals.

Materials and methods. The following reagents were used in the work: the substance KON-1, synthesized in PSPA and corresponding to the requirements of the draft pharmacopoeial article of the enterprise [18], and also the following reagents: acetonitrile (*HPLC grade, Merck*), hydrochloric acid diluted 8.3%, potassium dihydrogen phosphate (cp), chloroform (cp). The water for preparation of eluents was obtained using a Simplicity UV water purification system (Millipore, Merck).

Studies on working out the methods were carried out using a liquid chromatograph *LC-20 Prominence* (Shimadzu, Japan) with a diode-array detector, chromatographic column Luna 5uC18 (2) 100A (250 × 4.6 mm, Phenomenex). A mixture of acetonitrile and phosphate buffer (pH 7) was used as the mobile phase. The detection was carried out at the wavelength of 324 nm.

Urine samples were prepared by liquid-liquid extraction with chloroform. To do this, 1 ml of a model mixture was placed in an Eppendorf tube, acidified with diluted hydrochloric acid (8.3%) up to pH 3 using a universal indicator (50 µl). Then double extraction with chloroform was carried out in 0.5 ml portions using a tube vortex. The time of each extraction was 1 minute. The resulting emulsion was destroyed by centrifugation at 5000 rpm for 5 minutes. The organic layer was transferred to the evaporation cup, the dry residue after the removal of the extractant in the warm air stream was dissolved in 1 ml of methanol. The extracts were filtered

through membrane syringe nylon filters with a pore size of 0.45 µm [17].

The validation of the developed method was carried out in accordance with modern requirements for bioanalytical methods, in terms of selectivity, linearity, precision and accuracy [19, 20, 21].

The study of excretion of KOH-1 was performed on white non-linear male rats weighing 300-400 g, obtained from the vivarium of PSPA. The substance KOH-1 was administered once orally in the suspension of starch mucus at the dose of 100 mg/kg. Collecting excreta was performed in metabolic cages for 24 hours following administration of KOH-1.

Results and discussion. *Chromatography and detection conditions.* The previous studies have shown the effectiveness of using the eluent on the basis of acetonitrile and phosphate buffer (pH 7) for the analysis of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-one derivatives [22]. In this mobile phase, the maximum absorption of KOH-1 is 324 nm (Fig. 2), which ensures high selectivity of its determination in the analysis of such complex multi-component samples as extraction from biological objects. It was found out that the retention time of the test substance strongly depends on the concentration of phosphate buffer (pH 7) in the composition of the eluent.

Increasing the buffer solution in the eluent from 6% to 80% leads to the increase of the retention time from 3 to 11 minutes. A mixture of phosphate buffer (pH 7) and acetonitrile in a ratio of 75:25 at a flow of 1 ml / min provided an acceptable KOH-1 retention factor, good separation from adjacent chromatographic peaks, and then it was used as the mobile phase. The retention time of KOH-1 under these conditions was 5.5 min.

Method validation. Validation of the developed method for the quantitative determination of KOH-1 in urine by the HPLC-UV method was carried out in terms of selectivity, linearity, precision and accuracy in accordance with the requirements [19, 20, 21].

The selectivity of the method was established by analyzing the extracts from "blank" urine samples, as well as model urine mixtures with KOH-1 concentration of 20 µg / ml. The chromatograms of the extracts from the blank sample showed no peaks with retention time corresponding to the KOH-1 retention time, which indicates the selectivity of the technique (Fig. 3-4).

In assessing the linearity of the method, 8 model urine solutions (calibration standards) with concentration of KOH-1 in the range from 3 to 125 µg / ml were prepared and analyzed. The equation of the calibration graph had the form $Y = 2189 * X$. The correlation coefficient was 0.99865, which confirms the linearity of the technique in this range. The calibration graph is shown in Figure 5.

Table 1 shows the results of the reverse recalculation of the concentrations of calibration standards obtained using a calibration curve.

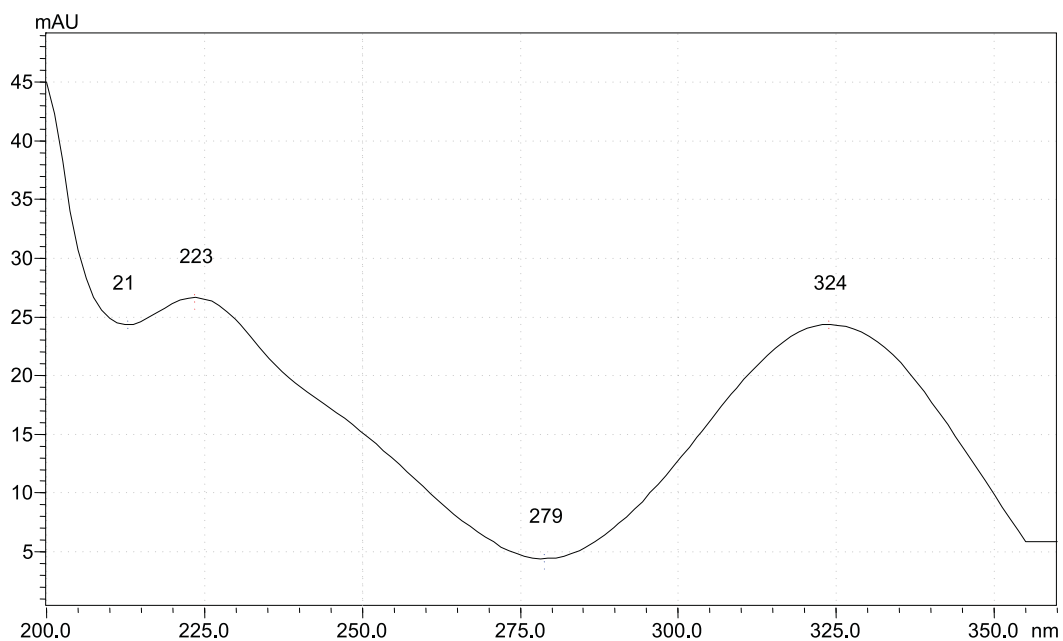


Figure 2 – UV spectrum of KOH-1 in the mobile phase

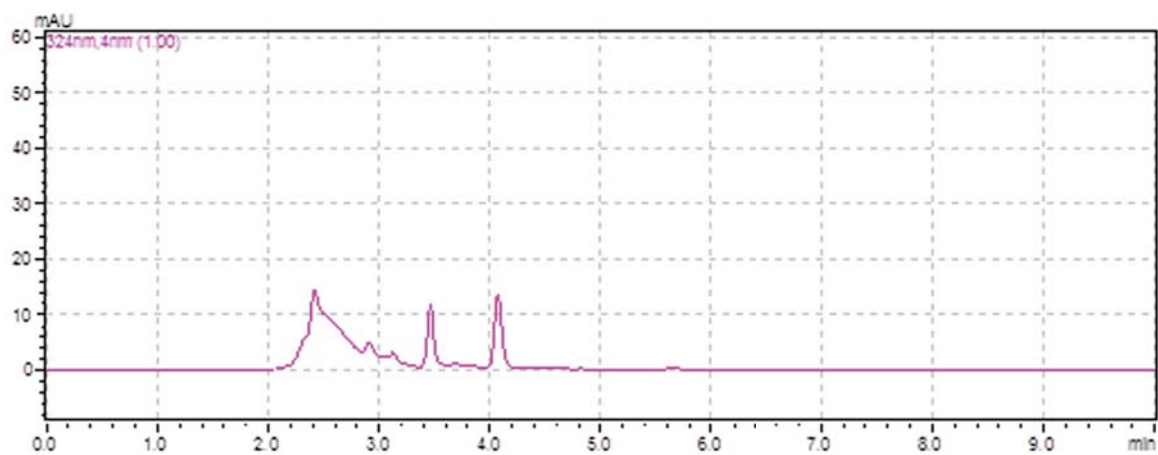


Figure 3 – Chromatogram of extraction from the “blank” sample of urine

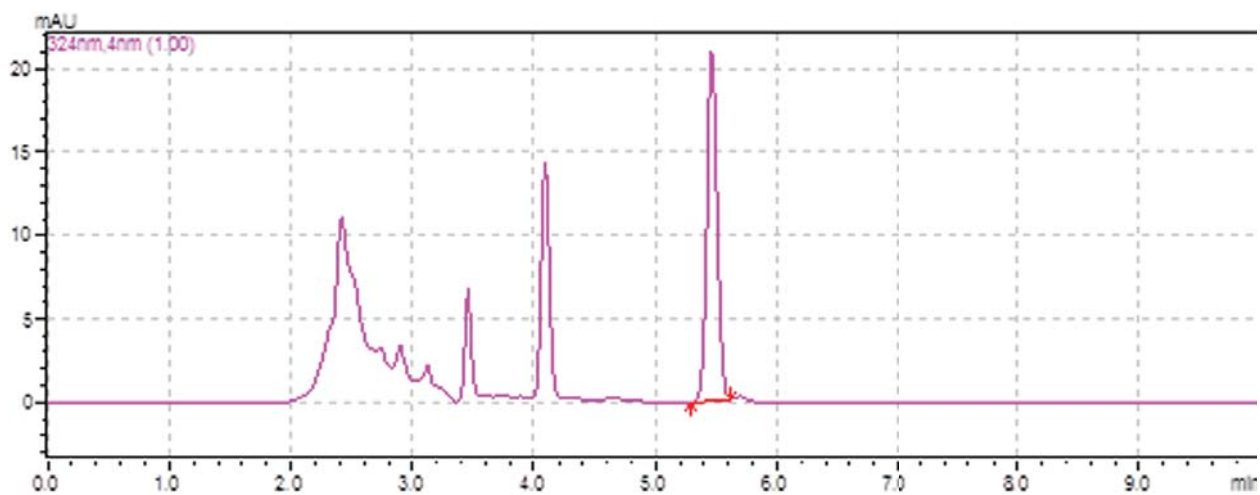


Figure 4 – Chromatogram of extract from the model mixture of urine with KOH-1 (20 µg / ml)

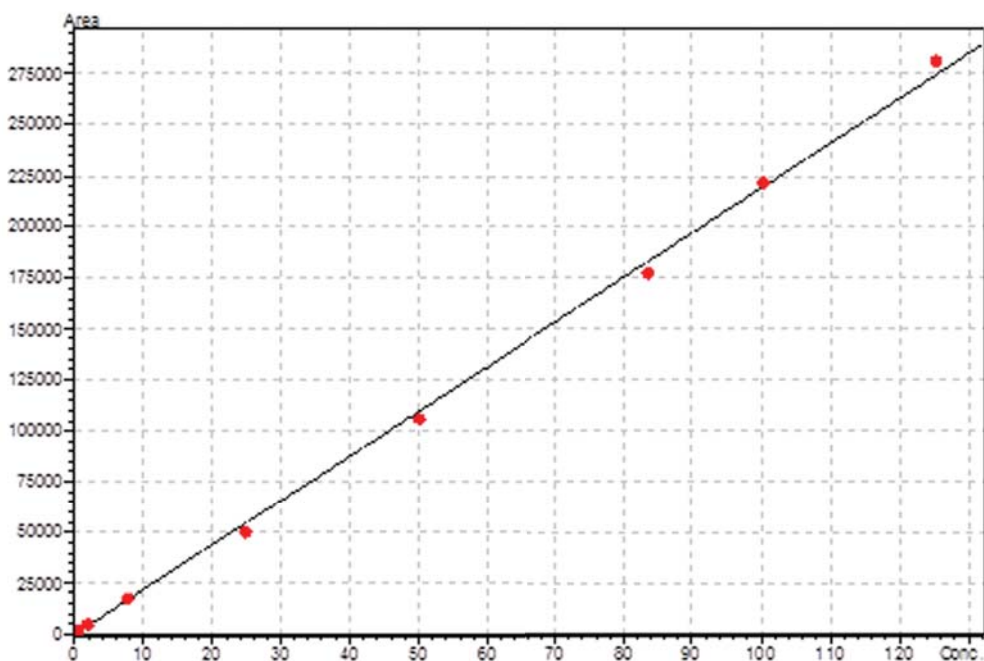


Figure 5 – Calibration graph for the quantitative determination of KOH-1 by HPLC

Table 1 – Deviations of concentrations of calibration standards from actual values

C_{act}	0.69	2.09	7.79	25.1	50.2	83.3	100.4	125.5
C_{calc}	0.63	2.15	7.84	22.97	48.23	81.46	100.86	128.84
$\epsilon, \%$	-8.7	2.87	5.0	-8.48	-3.92	-2.2	0.46	2.66
Norm	Not more than 20%	Not more than 15 %						

Experimentally calculated concentrations of calibration standards do not exceed $\pm 15\%$ of the nominal values, which corresponds to the acceptance criteria [19, 20, 21].

6 model bio-samples (quality control samples) at 5 concentration levels of KOH-1 (0.56; 3.36; 16.80; 62.75 and 111.56 $\mu\text{g} / \text{ml}$) were prepared to confirm the suitability

of the technique in terms of precision and accuracy. Preparation of the samples for the analysis was carried out in accordance with the described procedure. Precision and accuracy of the procedure were evaluated by the values of the relative standard deviation (RSD, %) and the relative error (δ , %), respectively. Metrological characteristics of the method are presented in Table 2.

Table 2 – Metrological characteristics of the quantitative determination of KOH-1 in urine by HPLC

Concentration of KOH-1 in the model mixture, $\mu\text{g} / \text{ml}$	Found concentration, $\mu\text{g} / \text{ml}$	\bar{X} (n = 6)	SD	RSD, %	δ , %
0.56	0.64; 0.58; 0.66; 0.53; 0.62; 0.57	0.60	0.0467	7.7817	7.14
3.36	3.12; 3.41; 3.90; 3.75; 4.01; 3.24	3.57	0.3352	9.3857	6.25
16.80	16.87; 16.95; 17.42; 16.84; 17.69; 18.06	17.31	0.3723	2.1512	3.04
62.75	55.51; 57.65; 58.47; 56.54; 59.57; 58.79	57.76	1.4375	2.4890	-7.95
111.56	98.57; 101.98; 102.53; 109.33; 100.05; 104.1	102.76	3.7075	3.6079	-7.89

The obtained control results do not exceed 15% allowed for bioanalytical methods, which indicates that there are no significant systematic errors in the results of the analysis [19, 20, 21].

Pharmacokinetic studies. The developed technique was used for preclinical pharmacokinetic studies on KOH-1 excretion in laboratory animals. An animal experiment was carried out in accordance with the legal norms for the use of animals in preclinical studies [23].

Study of excretion of KOH-1 was performed on

white non-linear male rats weighing 300-400 g, obtained from the vivarium of PSPA.

The animals were kept in stationary conditions in natural light mode on a standard diet. 20 hours before the experiment the animals were deprived of food. The substance KOH-1 was administered once orally in suspension of starch mucus at the dose of 100 mg/kg. Collecting excreta was performed in metabolic cages for 24 hours after administration of KOH-1. The results of quantitative analysis of KOH-1 in urine samples are presented in Table 3.

Table 3 – Daily content of KOH-1 in the urine of rats after a single oral administration at the dose of 100 mg / kg

Rat weight, g	Volume of urine, ml	Found concentration, µg / ml	% of the administered dose
320.0	17	94.75	5.0
400.0	19	60.23	2.9
370.0	21	83.58	4.9
340.0	14	141.83	5.9
350.0	17	87.08	4.2
340.0	24	67.87	4.7
			$\bar{X} = 4.6 \%$ SD = 1.0

So, the conducted studies showed that after a single oral administration of KOH-1 to the rats in the dose of 100 mg/kg, about 5% of the substance on average is excreted in the urine per day in the unchanged form.

Conclusion. The methods for the quantitative determination of KOH-1 in urine has been developed. It includes liquid-liquid extraction of the analyte and its subsequent determination by HPLC / UV.

The selectivity, linearity, accuracy and precision of the methodology were established by the validation evaluation. The technique has been successfully used in pharmacokinetic studies in the study of KOH-1 excretion in urine in laboratory animals. It is shown that after a single oral administration of KOH-1 to the rats in the dose of 100 mg/kg, about 5% of the substance on average is excreted in the urine per day in the unchanged form.

Библиографический список

1. Ушкалова Е.А., Ушкалова А.В. ФАРМАКОТЕРАПИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ // *РМЖ*. 2014. № 22. С. 1613.
2. Шуклина Н.С., Колла В.Э. АНТИАМНЕСТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ РЯДА 3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-ОНА // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003. № 6. С. 12–15.
3. Меньшикова Л.А., Печенкина И.Г., Береза Н.С. ОСОБЕННОСТИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (КОРОТКОЕ СООБЩЕНИЕ) // *Научно-производств. журнал*. Разработка и регистрация ЛС. 2013. № 1 (2). URL: <http://pharmjournal.ru/articles/stati/osobennosti-doklinicheskix-issledovaniy-innovacionnyix-lekarstvennyix-preparatov-korotkoe-soobshhenie> (дата обращения: 27.12.2016 г.)
4. Антонова М.И., Прокопов А.А., Ахапкина В.И., Берлянд А.С. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФЕНОТРОПИЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ // *Хим.-фарм. журн.* 2003. №10. С. 46–47.
5. Simpson R.C., Voppana V.K., Hwang B.Y., Rhodes G.R. DETERMINATION OF OXIRACETAM IN HUMAN PLASMA BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORIMETRIC DETECTION // *Journal of Chromatography*. 1993. No. 631 (1-2). P. 227–232.
6. Zhang J., Liang J., Tian Y., Zhang Z., Chen Y. SENSITIVE AND SELECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF ANIRACETAM IN HUMAN PLASMA // *Journal of chromatography B analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007. No. 858 (1-2). P. 129 - 134. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.08.010
7. Tian Y., Zhang J.J., Feng S.D., Zhang Z.J., Chen Y. PHARMACOKINETICS AND BIOEQUIVALENCE STUDY OF ANIRACETAM AFTER SINGLE-DOSE ADMINISTRATION IN HEALTHY CHINESE MALE VOLUNTEERS // *Arzneimittel – Forschung*. 2008. No. 58(10). P. 497-500. DOI: 10.1055/s-0031-1296547.
8. Cai S., Wang L. DETERMINATION OF ANIRACETAM'S MAIN METABOLITE, N-ANISOYL-GABA, IN

- HUMAN PLASMA BY LC-MS/MS AND ITS APPLICATION TO A PHARMACOKINETIC STUDY // *Journal of chromatography B analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012. No. 897. P. 50–54. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.04.007
9. Zhang Q., Yang W., Yang Y., Xing H., Zhang Q., Li J., Lu Y., He J., Yang S., Zhao D., Chen X. COMPARATIVE PHARMACOKINETIC STUDIES OF RACEMIC OXIRACETAM AND ITS PURE ENANTIOMERS AFTER ORAL ADMINISTRATION IN RATS BY A STEREOSSELECTIVE HPLC METHOD // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. No. 111. P. 153–158. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.03.039
 10. Son J., Lee J., Lee M., Lee E., Lee K.T., La S., Kim D.H. RAPID QUANTITATIVE ANALYSIS OF OXIRACETAM IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004. No. 36 (1). P. 183–187. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.05.010
 11. Wan X., Wang H., Ma P., Xi L., Sun J., He Z., Zhang X., Liu X. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF OXIRACETAM AND ITS DEGRADED SUBSTANCE IN RAT PLASMA BY HPLC-MS/MS AND ITS APPLICATION TO PHARMACOKINETIC STUDY AFTER A SINGLE HIGH-DOSE INTRAVENOUS ADMINISTRATION // *Journal of chromatography B analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2014. No. 969. P. 95–100. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.07.041
 12. Wang X., Zhu J., Xu R., Yang X., Wu H., Lin D., Ye F., Hu L. DETERMINATION OF PIRACETAM IN RAT PLASMA BY LC-MS/MS AND ITS APPLICATION TO PHARMACOKINETICS // *Biomedical Chromatography*. 2010. No. 24(10). P. 1108–1112. DOI: 10.1002/bmc.1412.
 13. Прокопов А.А., Котлова Л.И., Берлянд А.С. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСКРЕЦИИ ТЕТРАМЕЗИНА У КРЫС // *Хим.-фарм. журн.* 2006. Т. 40. № 3. С. 7–9.
 14. Прокопов А.А., Костебелов Н.В., Берлянд А.С. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСКРЕЦИИ АЛЬБИКАРА ИЗ ОРГАНИЗМА КРЫС // *Хим.-фарм. журн.* 2002. Т. 36. № 4. С. 7–9.
 15. Антонова М.И., Прокопов А.А., Ахапкина В.И., Берлянд А.С. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСКРЕЦИИ ПРЕПАРАТА ФЕНОТРОПИЛ ИЗ ОРГАНИЗМА КРЫС // *Хим.-фарм. журн.* 2004. Т. 38. № 11. С. 6–7.
 16. Farhan A.S., Nawab S., Nighat S., Alisha W.S., Ahmad M., Mehjebeen, Naseem H. DEVELOPMENT OF NEW METHOD FOR SIMULTANEOUS ANALYSIS OF PIRACETAM AND LEVETIRACETAM IN PHARMACEUTICALS AND BIOLOGICAL FLUIDS: APPLICATION IN STABILITY STUDIES // *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. Article ID 758283, 8 pages. DOI:10.1155/2014/758283
 17. Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ИЗВЛЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ПИРРОЛИН-2-ОНА ИЗ МОЧИ // *Инновационная наука: международный научный журнал*. 2015. Том 3. № 4/2015. С. 135–138.
 18. Кляшева О.Н., Ярыгина Т.И., Гейн В.Л., Одегова Т.Ф., Сагтарова О.Е., Карпенко Ю.Н. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ КОН-1 // *Фармация*. 2012. № 5. С. 8–10.
 19. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. Washington, DC, 2001. 25 p.
 20. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009. 23 p.
 21. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». 2016. 57 с.
 22. Мантуров Д.С., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И. Разработка условий определения биологически активного соединения ВКВ-1 методом ВЭЖХ для фармакокинетических исследований // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорская государственная фармацевтическая академия. Пятигорск, 2012. Вып. 67. С. 250–253.*
 23. Об утверждении Правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708-н. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_105953/ (дата обращения: 11.01.2017 г.)

References

1. Ushkalova E.A., Ushkalova A.V. FARMAKOTERAPIJA KOGNITIVNYH NARUSHENIJ RAZLICHOHO GENEZA: SOVREMENNOE SOSTOJANIE I PERSPEKTIVNYE NAPRAVLENIJA [PHARMACOTHERAPY OF COGNITIVE DISTURBANCES OF VARIOUS GENESIS: MODERN STATE AND PERSPECTIVE DIRECTIONS]. *RMZh [RMJ]*. 2014. N 22. P.1613. (In Russ.)
2. Shuklina N.S., Kolla V.Je. ANTIAMNESTICHESKOE DEJSTVIE PROIZVODNYH RJADA 3-GIDROKSI-3-PIRROLIN-2-ONA [ANTIAMINETIC ACTION OF THE DERIVATIVES OF 3-HYDROXY-3-PYRROLIN-2-ONE]. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija. [Experimental and clinical pharmacology]*. 2003. V. 66. N 6. P. 12–15. (In Russ.)
3. Men'shikova L.A., Pechenkina I.G., Bereza N.S. OSOBNOSTI DOKLINICHESKIH ISSLEDOVANIJ INNOVACIONNYH LEKARSTVENNYH PREPARATOV (KOROTKOE SOOBSHHENIE) [PECULIARITIES OF PRECLINICAL RESEARCH OF INNOVATIVE DRUGS (SHORT MESSAGE)]. *Nauchno-proizvodstv. zh-l. Razrabotka i registracija LS [Scientific production. Journal. Development and registration of drugs]*. 2013. N 2

- (2). URL: <http://pharmjournal.ru/articles/stati/osobennosti-doklinicheskix-issledovanij-innovacionnyix-lekarstvennyix-preparatov-korotkoe-soobshhenie> (access data: 27.12.2016) (In Russ.)
- Antnova M.I., Prokopov A.A., Ahapkina V.I., Berljand A.S. KOLICHESTVENNYJ ANALIZ FENOTROPILA V BIOLOGICHESKIH OB'EKTAH METODOM GAZOZHIDKOSTNOJ HROMATOGRAFIJ [QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOTROPILE IN BIOLOGICAL OBJECTS BY THE METHOD OF GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY] // *Him.-farm. zhurn. [Chem.-pharm. journal]*. 2003. N 10. P. 46–47. (In Russ.)
 - Simpson RC, Boppana VK, Hwang BY, Rhodes GR. DETERMINATION OF OXIRACETAM IN HUMAN PLASMA BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORIMETRIC DETECTION. *Journal of Chromatography*. 1993. N 631 (1-2). P. 227–232.
 - Zhang J, Liang J, Tian Y, Zhang Z, Chen Y. SENSITIVE AND SELECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF ANIRACETAM IN HUMAN PLASMA. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007. N 858 (1-2). P. 129–134. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.08.010
 - Tian Y, Zhang JJ, Feng SD, Zhang ZJ, Chen Y. PHARMACOKINETICS AND BIOEQUIVALENCE STUDY OF ANIRACETAM AFTER SINGLE-DOSE ADMINISTRATION IN HEALTHY CHINESE MALE VOLUNTEERS. *Arzneimittel – Forschung*. 2008. 58(10). P. 497–500. DOI: 10.1055/s-0031-1296547.
 - Cai S., Wang L. DETERMINATION OF ANIRACETAM'S MAIN METABOLITE, N-ANISOYL-GABA, IN HUMAN PLASMA BY LC-MS/MS AND ITS APPLICATION TO A PHARMACOKINETIC STUDY. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012. 897. P. 50–54. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.04.007
 - Zhang Q Yang W, Yang Y, Xing H, Zhang Q, Li J, Lu Y, He J, Yang S, Zhao D, Chen X. Comparative pharmacokinetic studies of racemic oxiracetam and its pure enantiomers after oral administration in rats by a stereoselective HPLC method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. 111. P. 153–158. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.03.039
 - Son J, Lee J, Lee M, Lee E, Lee JH, La S, Kim DH. RAPID QUANTITATIVE ANALYSIS OF OXIRACETAM IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004. No. 36 (1). P. 183–187. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.05.010
 - Wan X, Wang H, Ma P, Xi L, Sun J, He Z, Zhang X, Liu X. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF OXIRACETAM AND ITS DEGRADED SUBSTANCE IN RAT PLASMA BY HPLC-MS/MS AND ITS APPLICATION TO PHARMACOKINETIC STUDY AFTER A SINGLE HIGH-DOSE INTRAVENOUS ADMINISTRATION. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2014. 969. P. 95–100. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.07.041
 - Wang X, Zhu J, Xu R, Yang X, Wu H, Lin D, Ye F, Hu L. Determination of piracetam in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Biomedical Chromatography*. 2010. 24(10). P. 1108–1112. DOI: 10.1002/bmc.1412.
 - Prokopov A.A., Kotlova L.I., Berljand A.S. IZUCHENIE JEKSKRECIJ TETRAMEZINA U KRYK RATK [STUDY OF EXCRETION OF PREPARATION OF PHENOTROPIL FROM THE ORGANISM OF]. *Him.-farm. zhurn. [Chemical-farm. Journal]*. 2006. V. 40. N 3. P. 7–9. (In Russ.)
 - Prokopov A.A., Kostebelov N.V., Berljand A.S. IZUCHENIE JEKSKRECIJ AL'BIKARA IZ ORGANIZMA KRYK [STUDY OF ALBIKAR EXCRETION FROM THE ORGANISM OF RATS]. *Him.-farm. zhurn. [Chemical-farm. journal]*. 2002. V. 36. N 4. P. 7–9. (in Russ.)
 - Antonova M.I., Prokopov A.A., Ahapkina V.I., Berljand A.S. IZUCHENIE JEKSKRECIJ PREPARATA FENOTROPIL IZ ORGANIZMA KRYK [STUDY OF EXCRETION OF PREPARATION OF PHENOTROPIL FROM THE ORGANISM OF RATS]. *Him.-farm. zhurn. [Chemical-farm. journal]*. 2004. V. 38. N 11. P. 6–7. (in Russ.)
 - Farhan A.S., Nawab S., Nighat S., Alisha W.S., Ahmad M., Mehjabeen, Naseem H. DEVELOPMENT OF NEW METHOD FOR SIMULTANEOUS ANALYSIS OF PIRACETAM AND LEVETIRACETAM IN PHARMACEUTICALS AND BIOLOGICAL FLUIDS: APPLICATION IN STABILITY STUDIES. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. Article ID 758283, 8 pages. DOI:10.1155/2014/758283
 - Bulgakova E.A., Karpenko Ju.N. VYBOR OPTIMAL'NYH USLOVIJ IZVLECHENIJA BIOLOGICHESKI AKTIVNYH PROIZVODNYH 3-PIRROLIN-2-ONA IZ MOCHA [THE CHOICE OF OPTIMAL CONDITIONS OF EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE DERIVATIVES OF 3-PYRROLIN-2-SHE FROM URINE]. *Innovacionnaja nauka: mezhdunarodnyj nauchnyj zhurnal [Innovative science: an international scientific journal]*. Ufa, 2015. N 4/2015. Ch. 3. P. 135–138. (in Russ.)
 - Kljashaeva O.N., Jarygina T.I., Gejn V.L., Odegova T.F., Sattarova O.E., Karpenko Ju.N. Razrabotka metodov ocenki kachestva substancii novogo biologicheskij aktivnogo soedinenija KON-1 [DEVELOPMENT OF METHODS OF ESTIMATION OF THE QUALITY OF THE SUBSTANCE OF THE NEW BIOLOGICALLY ACTIVE CONNECTION OF CON-1]. *Farmacija [Pharmacy]*. Moskva, 2012. N 5. P. 8–10. (in Russ.)
 - Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. Washington, DC, 2001. 25 p.
 - Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009. 23 p.
 - Reshenie Soveta Evrazijskoj jekonomicheskij komissii ot 03.11.2016 № 85 «Ob utverzhenii Pravil provedenija issledovanij biojektivnostij lekarstvennyh preparatov v ramkah Evrazijskoj jekonomicheskogo sojuza».

- [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of 03.11.2016 No. 85 "On the Approval of the Rules for Conducting Studies on the Bioequivalence of Medicinal Products within the Framework of the Eurasian Economic Union"]. 2016. 57 p. (in Russ.)
22. Manturov D.S., Karpenko Ju.N., Jarygina T.I. Razrabotka uslovij opredelenija biologicheski aktivnogo soedinenija VKV-1 metodom VJeZhH dlja farmakokineticheskikh issledovanij [Development of conditions for the determination of the biologically active compound BKV-1 by HPLC for pharmacokinetic studies]. Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii: sb. nauch. tr. [Development, research and marketing of new pharmaceutical products: Sat. sci. tr.] / Pjatigorskaja gosudarstvennaja farmacevticheskaja akademija [Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy]. Pyatigorsk, 2012. V. 67. P. 250–253. (in Russ.)
23. Ob utverzhdenii Pravil laboratornoj praktiki: prikaz Ministerstva zdavoohranenija i social'nogo razvitija Rossijskoj Federacii ot 23 avgusta 2010 g. №708-n [On the approval of the Rules of laboratory practice: the order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of August 23, 2010 № 708-n]. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_105953/ (access data: 11.01.2017). (in Russ.)

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Карпенко Юлия Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и валидация биоаналитических методик, исследования в области фармацевтического и химико-токсикологического анализа, фармакокинетические исследования, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: karpenko_pfa@mail.ru

Ярыгина Татьяна Ивановна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии факультета очного обучения, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка методов контроля качества и стандартизации биологически активных соединений из групп производных гамма-аминомасляной кислоты и 3-гидрокси-3-пирролин-2-она; разработка новых и совершенствование известных спектрофотометрических методик анализа лекарственных средств.

Булгакова Евгения Александровна – ассистент кафедры токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и валидация биоаналитических методик, фармакокинетические исследования, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: bugakova_pfa@mail.ru

Autors:

Karpenko Julia Nikolaevna – Candidate of Sciences (Pharmacy), Associate Professor of the Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and validation of bioanalytical techniques, research in the field of pharmaceutical and chemical-toxicological analysis, pharmacokinetic studies, high-performance liquid chromatography. E-mail: karpenko_pfa@mail.ru

Jarygina Tatyana Ivanovna – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Full-time Studies, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development of methods for quality control and standardization of biologically active compounds from gamma-aminobutyric acid and 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-one groups; development of new and improvement of known spectrophotometric methods of drug analysis.

Bulgakova Evgenia Aleksandrovna – assistant of the Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and validation of bioanalytical techniques, pharmacokinetic studies, high-performance liquid chromatography. E-mail: bugakova_pfa@mail.ru

Поступила в редакцию: 21.06.17

Принята к печати: 01.08.17

Received: 21.06.17

Accepted for publication: 01.08.17