

Методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка фексофенадина в лизате клеток Caco-2

© Копаница М. А., Транова Ю. С., Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю.,
Калинкина О. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Российская Федерация

Аннотация. Один из способов анализа активности ABCB1-белка — это оценка накопления его субстрата фексофенадина (Ф.) внутри тест-клеток. **Цель** — разработка и валидация методики количественного анализа Ф. в лизате клеток Caco-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС. **Материалы и методы.** В качестве матрицы использовался лизат клеток Caco-2. Анализ выполняли на хроматографе «Ultimate 3000» с тройным квадрупольным масс-детектором TSQ Fortis, колонкой UCT Selectra C18 4,6 мм×100 мм 5 мкм в градиентном режиме элюирования. Скорость подвижной фазы — 0,3 мл/мин, объем пробы — 20 мкл, режим ионизации — положительный, внутренний стандарт — амантадин (нг/мл). Пробоподготовка — осаждение белка лизата клеток ацетонитрилом. Методику валидировали по параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения (НПКО), правильность, прецизионность, перенос пробы и стабильность образцов. **Результаты.** На хроматограммах холостого лизата клеток Caco-2 не было пиков со временем удерживания, характерным для Ф. (5,70 мин) и амантадина (3,58 мин). НПКО Ф. составил 0,5 нг/мл. Перенос Ф. не превышал 20 % НПКО, а амантадина — 5 %. По результатам анализа трёх серий градуировочных стандартов (0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл) получены уравнения линейной регрессии, коэффициенты корреляции превышали 0,99. Правильность и прецизионность оценивали внутри и между циклами, выполняя анализ растворов Ф. в матрице (0,5; 1,5; 25 и 40 нг/мл) в рамках трёх циклов. Параметры не превышали 20 % для НПКО и 15 % — для остальных точек. Стабильность растворов Ф. (1,5 и 40 нг/мл) в лизате анализировали при хранении при комнатной температуре, после 3-кратной заморозки–разморозки, хранении при -80 °С 60 сут., после пробоподготовки и нахождения в автосемплере 24 ч. Правильность находилась в пределах 15 % от номинальных значений. **Выводы.** Разработана и валидирована методика количественного определения Ф. в лизате клеток Caco-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; фексофенадин; ABCB1-белок; лизат клеток Caco-2

Для цитирования:

Копаница М. А., Транова Ю. С., Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю., Калинкина О. В., Якушева Е. Н. Методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка фексофенадина в лизате клеток Caco-2. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):60–68. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-60-68>

Поступила: 25 марта 2023 г. **Принята:** 30 марта 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Method for quantitative analysis of the marker substrate ABCB1-protein fexofenadine in Caco-2 cell lysate

© Maria A. Kopanitsa, Yulia S. Tranova, Ivan V. Chernykh, Alexey V. Shchulkin, Pavel Yu. Mylnikov, Oksana V. Kalinkina, Elena N. Yakusheva
Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Abstract. One way to analyze the activity of the ABCB1 protein is to assess the accumulation of its substrate fexofenadine (F.) inside the test cells. **The goal** is to develop and validate a method for the quantitative analysis of F. in Caco-2 cell lysate using HPLC-MS/MS. **Materials and methods.** Caco-2 cell lysate was used as a matrix. The analysis was performed on an "Ultimate 3000" chromatograph with a TSQ Fortis triple quadrupole mass detector, a UCT Selectra C18 4.6 mm*100 mm 5 µm column in a gradient elution mode. The mobile phase rate was 0.3 ml/min, the sample volume was 20 µl, the ionization mode was positive, and the internal standard was amantadine (ng/ml). Sample preparation — precipitation of cell lysate protein with acetonitrile. The method was validated for the following parameters: selectivity, linearity, lower limit of quantitation (LLOQ), correctness, precision, sample transfer and sample stability. **Results.** Chromatograms of the blank lysate of Caco-2 cells showed no peaks with retention times characteristic of F. (5.70 min) and amantadine (3.58 min). NPKO F. was 0.5 ng/ml. F.'s transfer did not exceed 20% of NPKO, and amantadine — 5%. Based on the results of the analysis of three series of calibration standards (0.5; 1; 1.5; 5; 10; 25; 40; 50 ng/ml), linear regression equations were obtained, the correlation coefficients exceeded 0.99. Accuracy and precision were assessed within and between cycles by analyzing F. solutions in the matrix (0.5; 1.5; 25 and 40 ng/ml) within three cycles. The parameters did not exceed 20% for LLPO and 15% for other points. The stability of F. solutions (1.5 and 40 ng/ml) in the lysate was analyzed during storage at room temperature, after 3-fold freezing-thawing, storage at -80 °C for 60 days, after sample preparation and being in the autosampler for 24 hours. The accuracy was within 15% of the nominal values. **Conclusions.** A method for the quantitative determination of F. in Caco-2 cell lysate using HPLC-MS/MS has been developed and validated.

Keywords: HPLC-MS/MS; fexofenadine; ABCB1 protein; Caco-2 cell lysate

For citations:

Kopanitsa MA, Tranova YuS, Chernykh IV, Shchulkin AV, Mylnikov PYu, Kalinkina OV, Yakusheva EN.

Method for quantitative analysis of the marker substrate ABCB1-protein fexofenadine in Caco-2 cell lysate. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):60–68. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-60-68>

Received: March 25, 2023. **Accepted:** March 30, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

АВСВ1-белок представляет собой АТФ-зависимый мембранный транспортёр, принадлежащий к суперсемейству АВС-транспортёров (Adenosine-Binding-Cassete), функционирующий как насос, удаляющий из клеток во внеклеточное пространство липофильные вещества эндогенной и экзогенной природы. Спектр его субстратов включает порядка 50 % современных лекарственных средств различных фармакологических групп [1]. В связи с вариабельной активностью, которая может изменяться под действием различных факторов, в том числе в результате приёма лекарственных средств, актуальной является оценка эффлюксной активности АВСВ1-белка для прогнозирования возможных межлекарственных взаимодействий. Кроме того, подобный анализ позволит осуществлять поиск веществ с ингибирующим потенциалом по отношению к транспортёру с перспективой их дальнейшего применения при патологиях, в основе патогенеза которых лежит его гиперактивность (множественная лекарственная устойчивость опухолей, резистентная к фармакотерапии эпилепсия и др. [2]).

На сегодняшний день утверждены отечественные [3] и зарубежные рекомендации [4, 5], предписывающие тестирование всех вновь разрабатываемых лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам АВСВ1-белка. Причём на первом этапе анализ проводится *in vitro* (путём оценки транспорта маркерных субстратов белка, таких как фексофенадин, дигоксин, домперидон и др. средств, на гиперэкспрессирующих его клеточных культурах), а в случае положительных результатов — *in vivo* (анализируется фармакокинетика маркерных субстратов транспортёра на животных и в клинических исследованиях).

Фексофенадин — блокатор H1-гистаминовых рецепторов III поколения, внутриклеточное проникновение которого контролируется АВСВ1-белком [4]. В этой связи интенсивность его накопления в клетках может характеризовать функциональную активность транспортёра. Суть эксперимента по анализу влияния лекарственных веществ на активность АВСВ1-белка *in vitro* сводится к исследованию количества фексофенадина, которое проникло внутрь клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2, которые после 21-дневной инкубации на плоской подложке спонтанно дифференцируются в культуру, подобную эпителиоцитам тонкого кишечника с повышенным содержанием транспортёра на апикальных мембранах [6]. Оценка количества фексофенадина проводится в клеточном лизате — в контроле (после инкубации с веществом в течение определённого времени) и на фоне добавления в среду инкубации потенциального ингибитора белка-транспортёра.

Продemonстрированная насыщаемость АВСВ1-белка [7] диктует необходимость добавления фексофенадина в питательную среду в относительно низ-

кой концентрации (по нашим данным, до 300 мкМ). Степень внутриклеточного накопления вещества незначительна. Таким образом, анализ количества фексофенадина внутри клетки требует применения высокочувствительной методики. В свою очередь большое количество балластных веществ в клеточном лизате объясняет повышенные требования к её селективности. Указанным требованиям удовлетворяет высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-детектированием.

Целью / Aim исследования явилась разработка и валидация методики количественного анализа фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы / Materials and methods

В качестве матрицы для разработки и валидации методики использовался лизат клеток Сасо-2 после их культивирования на плоской подложке (в лунках 6-луночного планшета) в течение 21 дня [6]. Приготовление лизата производили следующим образом: клетки с одной лунки снимали раствором трипсин-ЭДТА, трижды промывали 1 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) с последующим центрифугированием при 1500 g в течение 5 минут, затем лизировали с помощью цикла трёхкратной заморозки/разморозки в 350 мкл буферного раствора.

В качестве стандарта при разработке методики использовали субстанцию фексофенадина гидрохлорида (United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США). Структурная формула вещества и фрагментация его молекулы представлены на рис. 1.

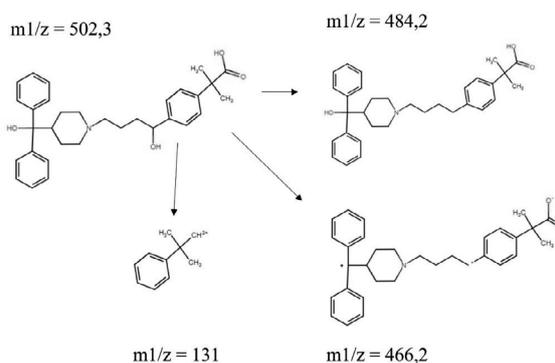


Рис. 1. Структурная формула фексофенадина и фрагментация его молекулы

Fig. 1. Structural formula of fexofenadine and fragmentation of its molecule

Матричный раствор фексофенадина готовили с концентрацией 1 мг/мл в метаноле и хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рабочие растворы (с концентрациями 5; 10; 15; 50; 100; 250; 400; 500 нг/мл) готовили из матричного путём его разбавления метанолом.

Градуировочные стандарты с концентрациями 0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл и образцы для контроля качества с концентрациями 0,5; 1,5; 25; 40 нг/мл готовили разведением рабочих растворов матрицей. Аналитический диапазон методики выбирали на основе концентраций, ожидаемых в исследовании на указанной клеточной линии.

В качестве внутреннего стандарта использовали амантадин (амантадин гидрохлорид, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США) в концентрации 10 нг/мл, для этого к 49950 мкл ацетонитрила добавляли 50 мкл раствора амантадина в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл.

Количественный анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённом автосемплером, дегазатором, градиентным насосом и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Управление системой и математическую обработку данных проводили с помощью программы «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Использовали обращённо-фазную хроматографическую колонку UCT Selectra C18 4,6 мм×100 мм 5 мкм, 100 А и предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM.

Применялся градиентный режим элюирования смесью раствора муравьиной кислоты 0,1 % в воде для ВЭЖХ и ацетонитрила (табл. 1). Скорость подвижной фазы составила 0,3 мл/мин при температуре 35 °С, объём вводимой пробы — 20 мкл.

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы по объёму

Table 1

Ratio of mobile phase components by volume

Время	Раствор муравьиной кислоты 0,1 %	Ацетонитрил
0 мин	75 %	25 %
0,2 мин	30 %	70 %
6 мин	1 %	99 %
8 мин	75 %	25 %

Время одного анализа составляло 10 мин, время удерживания фексофенадина соответствовало $5,70 \pm 0,091$ мин. Для приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: вода ВЭЖХ-МС («VWR», №21F104014; Франция), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», №0001900259; Испания), ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ («Химмед», Россия).

Молекулы фексофенадина ионизировали в положительном режиме на электроспрее при напряжении 3500 В; скорость потока оболочечного газа (sheath gas) составляла 50 Arb, вспомогательного газа (aux

gas) — 10 Arb, продувочного газа (sweep gas) — 1 Arb, температура трубки для переноса ионов — 300 °С, температура испарителя — 350 °С. Для детектирования фексофенадина использовали следующие переходы масс: 502,3 m/z → 131 m/z при энергии столкновения 42 В, 502,3 m/z → 466,2 m/z при энергии столкновения 27 В и 502,3 m/z → 484,2 m/z при энергии столкновения 22 В, фрагментация источника 5, CID gas 1,5 mTorr. Переходы масс для амантадина 152,1 m/z → 79,08 m/z при энергии столкновения 33 В и 152,1 m/z → 135,08 m/z при энергии столкновения 17 В.

Пробоподготовка заключалась в осаждении белка и других высокомолекулярных веществ матрицы ацетонитрилом. Для этого к 300 мкл пробы клеточного лизата добавляли 300 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом в концентрации 10 нг/мл, перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия), центрифугировали на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США) при 25000 г в течение 10 мин при температуре 4 °С.

Для расчёта метрологических характеристик и основных валидационных параметров разработанной методики применяли программы «Statistica 13.0» и «Microsoft Excel». Биоаналитическую методику валидировали по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), матричный эффект, перенос пробы и стабильность образцов в соответствии с Руководством по экспертизе лекарственных средств, Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 №85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2018 и Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London; 2011.

Результаты / Results

Селективность (избирательность) разработанной методики определяли, анализируя 6 холостых проб лизата клеток Сасо-2 без добавления стандарта фексофенадина и внутреннего стандарта и образцы лизата с добавлением фексофенадина с концентрацией 50 нг/мл и внутреннего стандарта с концентрацией 10 нг/мл. На хроматограммах образцов холостого клеточного лизата не наблюдали пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания фексофенадина и амантадина (рис. 2—4).

Влияние (эффект) переноса оценивали, анализируя холостой образец лизата клеток Сасо-2 после инъекции пробы с фексофенадином с концентрацией

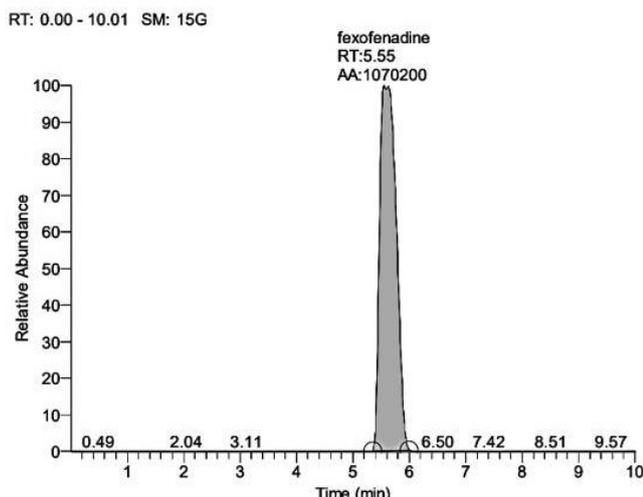


Рис. 2. Хроматограмма лизата клеток Caco-2 с добавлением фексофенадина с концентрацией 50 нг/мл
Fig. 2. Chromatogram of Caco-2 cell lysate with the addition of fexofenadine at a concentration of 50 ng/ml

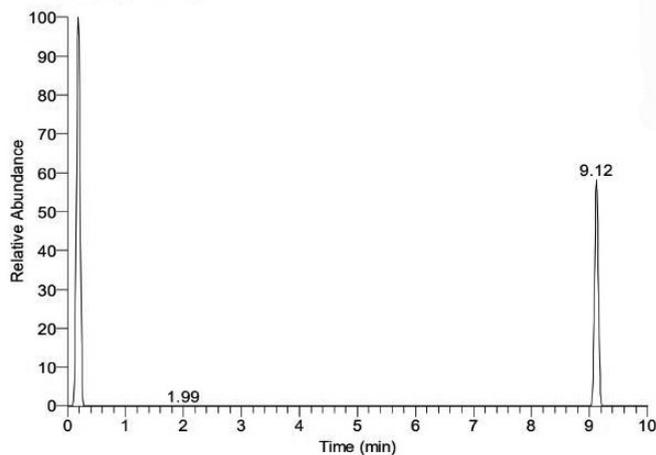


Рис. 4. Хроматограмма лизата клеток Caco-2 без добавления фексофенадина и амантадина
Fig. 4. Chromatogram of Caco-2 cell lysate without addition of fexofenadine and amantadine

Примечания: RT (retention time) — время удерживания; AA (automatic area) — площадь пика.
Notes: RT — retention time; AA — automatic area.

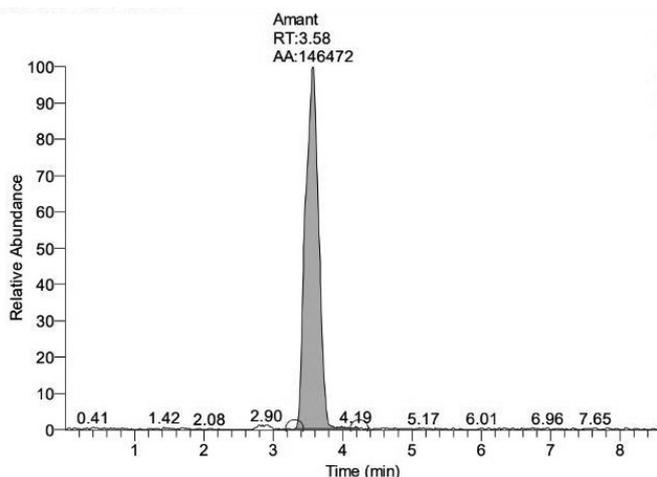


Рис. 3. Хроматограмма лизата клеток Caco-2 с добавлением раствора амантадина с концентрацией 10 нг/мл
Fig. 3. Chromatogram of Caco-2 cell lysate with the addition of amantadine solution with a concentration of 10 ng/ml

Примечания: RT (retention time) — время удерживания; AA (automatic area) — площадь пика.
Notes: RT — retention time; AA — automatic area.

50 нг/мл и амантадина с концентрацией 10 нг/мл. На хроматограмме холостого образца клеточного лизата перенос фексофенадина не превышал 20 % величины нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % — для внутреннего стандарта.

Нижний предел количественного определения (НПКО) фексофенадина в лизате клеток Caco-2 составил 0,5 нг/мл. При этом сигнал фексофенадина из образца с НПКО превосходил более чем в 5 раз величину сигнала холостого образца, а правильность и прецизионность определения не превышали 20 %.

Градуировочную кривую строили, анализируя 8 градуировочных стандартов, представляющих собой образцы лизата клеток Caco-2 с добавлением рабочих растворов фексофенадина до получения концентраций 0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл. С помощью полученных значений были построены калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации вещества (образец одного из графиков приведён на рис. 5).

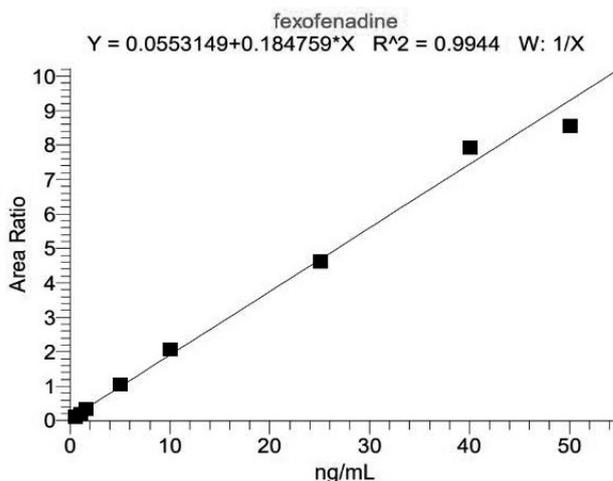


Рис. 5. Образец калибровочного графика зависимости «концентрация фексофенадина — площадь пика»
Fig. 5. Sample calibration graph of the dependence "fexofenadine concentration — peak area"

По результатам анализа трёх серий градуировочных стандартов были получены уравнения линейной регрессии:

Таблица 2

Отклонения концентраций градуировочных стандартов фексофенадина от их номинальных значений

Table 2

Deviations of concentrations of fexofenadine calibration standards from their nominal values

Концентрация номинальная, нг/мл	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
0,500	0,523	4,5	0,584	16,8	0,428	14,3
1,000	0,948	5,2	0,917	8,3	0,893	10,7
1,500	1,521	1,4	1,619	7,9	1,623	8,2
5,000	5,540	10,8	4,872	2,6	5,415	8,3
10,000	9,772	2,3	8,977	10,2	11,026	10,3
25,000	25,873	3,5	22,000	12,0	24,836	0,7
40,000	38,621	3,5	40,748	1,9	42,705	6,8
50,000	50,742	1,5	53,283	6,6	46,074	7,9

$Y = 0,0553149 + 0,184759 \cdot X$ $R^2 = 0,9944$ $W: 1/X$,
 $Y = 0,000945174 + 0,138063 \cdot X$ $R^2 = 0,9991$ $W: 1/X$,
 $Y = 0,0197284 + 0,131622 \cdot X$ $R^2 = 0,9938$ $W: 1/X$.

Полученные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99).

Отклонения концентраций градуировочных стандартов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в табл. 2. Данная таблица дополнительно характеризует линейность и демонстрирует близость каждой точки к калибровочной кривой. Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений, а для НПКО — в пределах $\pm 20\%$ (табл. 2).

Правильность и прецизионность оценивали, выполняя анализ образцов контролей качества фексофенадина с концентрациями 0,5; 1,5; 25 и 40 нг/мл в рамках трёх циклов: параметры оценивали внутри и между циклами. Полученные величины правильности и прецизионности составили не более 20 % для НПКО и не более 15 % — для остальных точек (табл. 3 и 4).

Матричный эффект оценивали по площади пиков фексофенадина в присутствии лизата клеток Сасо-2 и отдельно в воде с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, взятой из 6 отдельных лунок планшета с клетками линии Сасо-2, не превышало 15 %, средняя точность для образца контроля качества с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл составила 6,7 и 3,0 %, соответственно.

Стабильность растворов фексофенадина с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл в клеточном лизате анализировали при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трёхкратной заморозке–разморозке при $-80\text{ }^\circ\text{C}$, при хранении при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 60 суток, после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч. Выполняли по 3 повтора для каждого вида стабильности. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) на-

ходилась в пределах 15 % от номинальных значений (табл. 5).

Обсуждение / Discussion

FDA требует все потенциально выходящие на рынок лекарственные средства подвергать анализу на их возможную принадлежность к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка [4, 5]. При этом анализ *in vitro* обладает экспрессностью, относительной экономической доступностью, не сопряжён с биоэтическими сложностями и позволяет проводить скрининговый отбор веществ с ингибирующим потенциалом по отношению к транспортёру.

Ведущим методом исследования фармакокинетики лекарственных средств как на доклиническом, так и на клиническом этапах является ВЭЖХ. Причём наиболее селективным и чувствительным методом детектирования считается использование МАСС-детектора [8].

В научной литературе представлен ряд ВЭЖХ-методик количественного анализа фексофенадина. Однако часть из них предполагает использование низкочувствительного УФ-детектора [9, 10], что в нашем случае не позволит детектировать низкое внутриклеточное содержание целевого вещества. Некоторые методики предлагают анализ вещества в биожидкостях [11, 12] или гомогенатах органов [10, 13], что подразумевает более сложную пробоподготовку. Ряд методик с использованием ВЭЖХ-МС/МС при анализе фексофенадина в клеточном лизате обладают более низкой чувствительностью [14].

Предлагаемая нами методика характеризуется чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения, высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью и линейностью в диапазоне рабочих концентраций. Её применение может быть рекомендовано для оценки внутриклеточного накопления

Таблица 3

Правильность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 внутри цикла

Table 3

Correctness and precision of the method of quantitative determination of fexofenadine in Caco-2 cell lysate within the cycle

Концентрация номинальная, нг/мг	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Правильность, %	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность средняя, %	SD	Прецизионность, %
0,500	0,454	9,2	0,5134	7,7	0,04328	8,4
	0,483	3,4				
	0,528	5,6				
	0,551	10,2				
	0,551	10,2				
1,500	1,723	14,9	1,5532	8,1	0,1551	10,0
	1,714	14,3				
	1,385	7,7				
	1,480	1,3				
	1,464	2,4				
25,000	25,751	3,0	24,9794	1,7	0,6342	2,5
	24,810	0,8				
	24,033	3,9				
	25,029	0,1				
	25,274	1,1				
40,000	37,645	5,9	39,4172	2,3	1,1780	3,0
	39,494	1,3				
	40,111	0,3				
	39,075	2,3				
	40,761	1,9				

Таблица 4

Правильность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 между циклами

Table 4

Correctness and precision of the method of quantitative determination of fexofenadine in Caco-2 cell lysate between cycles

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация, рассчитанная по трём различным уравнениям регрессии, нг/мл	Правильность, %	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность средняя, %	SD	Прецизионность, %
0,500	0,513	7,7	0,486	10,8	0,02946	6,1
	0,455	11,2				
	0,489	13,3				
1,500	1,553	8,1	1,472	5,7	0,07741	5,3
	1,464	2,4				
	1,399	6,7				
25,000	24,979	1,8	24,319	5,67	1,9851	8,2
	25,890	3,6				
	22,088	11,6				
40,000	39,417	2,3	38,597	5,3	0,8933	2,3
	37,645	6,5				
	38,728	7,2				

Таблица 5

Правильность при определении стабильности растворов фексофенадина с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл

Table 5

Correctness in determining the stability of fexofenadine solutions with concentrations of 1.5 and 40 ng/ml

Условия	Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность, %
Хранение при комнатной температуре	1,500	1,427	4,9
	40,000	38,883	3,9
Трёхкратная заморозка–разморозка при –80 °С	1,500	1,607	12,3
	40,000	37,279	4,2
Хранение при –80 °С в течение 60 суток	1,500	1,443	3,8
	40,000	37,446	6,4
После пробоподготовки и нахождения в автоемплере в течение 24 ч	1,500	1,397	6,9
	40,000	36,301	9,3

маркерного субстрата ABCB1-белка фексофенадина при анализе функциональной активности данного белка-транспортера *in vitro* и оценке лекарственных веществ на принадлежность к числу модуляторов его активности.

Заключение / Conclusions

Разработана и валидирована методика количественного определения маркерного субстрата ABCB1-белка — фексофенадина в лизате клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ADDITIONAL INFORMATION**

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

Финансирование. Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам (Конкурс СП-2022) (приказ Минобрнауки России от 20.01.2022 №38).

Financing. The work was supported by the scholarship of the President of the Russian Federation for young scientists and postgraduates (SP-2022 Competition) (Order of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 38 dated 20.01.2022).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Копаница Мария Андреевна
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: kopanitsa412@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-4538>
 SPIN-код: 8147-5006
 Ассистент кафедры фармацевтической химии
 ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань,
 Российская Федерация

Maria A. Kopanitsa
 Corresponding author
 e-mail: kopanitsa412@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-4538>
 SPIN code: 8147-5006
 Assistant of the Department of Pharmaceutical
 chemistry RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Транова Юлия Сергеевна
 e-mail: yulyatran@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>
 SPIN-код: 2732-8760
 Ассистент кафедры фармацевтической химии
 ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань,
 Российская Федерация

Yulia S. Tranova
 e-mail: yulyatran@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>
 SPIN code: 2732-8760
 Assistant of the Department of Pharmaceutical
 chemistry RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Черных Иван Владимирович
 e-mail: ivchernykh88@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>
 SPIN-код: 5238-6165
 Заведующий кафедрой фармацевтической
 химии, д.б.н., доц. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
 России, Рязань, Российская Федерация

Ivan V. Chernykh
 e-mail: ivchernykh88@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>
 SPIN code: 5238-6165
 Head of the Department of Pharmaceutical Chem-
 istry, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor RyazSMU,
 Ryazan, Russian Federation

Шулькин Алексей Владимирович

e-mail: alekseishulkin@rambler.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
 SPIN-код: 2754-1702
 Профессор кафедры фармакологии, д.м.н., доц.
 ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань,
 Российская Федерация

Alexey V. Shchulkin

e-mail: alekseishulkin@rambler.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
 SPIN code: 2754-1702
 Professor of the Department of Pharmacology,
 Dr. Sci. (Med), Associate Professor RyazSMU,
 Ryazan, Russian Federation

Мыльников Павел Юрьевич

e-mail: pavelmylnikov@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
 SPIN-код: 8503-3082
 Ассистент кафедры фармакологии, к.б.н.
 ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань,
 Российская Федерация

Pavel Yu. Mylnikov

e-mail: pavelmylnikov@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
 SPIN code: 8503-3082
 Assistant of the Department of Pharmacology,
 Cand. Sci. (Biol.) RyazSMU, Ryazan, Russian
 Federation

Калинкина Оксана Владимировна

e-mail: kalinkina.oksanka@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4005-4076>
 SPIN-код: 1034-2457
 Старший преподаватель кафедры фармацевти-
 ческой химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
 России, Рязань, Российская Федерация

Oksana V. Kalinkina

e-mail: kalinkina.oksanka@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4005-4076>
 SPIN code: 1034-2457
 Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical
 Chemistry RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Якушева Елена Николаевна

e-mail: enya.rzn@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
 SPIN-код: 2865-3080
 Заведующий кафедрой фармакологии, д.м.н.,
 проф. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
 Рязань, Российская Федерация

Elena N. Yakusheva

e-mail: enya.rzn@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
 SPIN code: 2865-3080
 Head of the Department of Pharmacology,
 Dr. Sci. (Med), Professor RyazSMU, Ryazan,
 Russian Federation

Список литературы / References

1. Spudich A, Kilic E, Xing H, et al. Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia. *Nat Neurosci.* 2006 Apr;9(4):487–8. DOI: 10.1038/nn1676.
 2. Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Роль гликопротеина-Р в неврологии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2017;117(1):67–71.
 [Chernykh IV, Shchulkin AV, Yakusheva EN, Popova NM. A role of P-glycoprotein in neurology. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2017;117(1):67–71. (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro20171171167-71.
 3. Сычев Д.А., Кукес В.Г., Каркищенко Н.Н. Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных: руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2014. [Sychev DA, Kukes VG, Karkishhenko NN. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu biotransformacii i transporterov novy'x lekarstvenny'x sredstv: dizajn issledovanij, analiz danny'x: rukovodstvo po e'kspertize lekarstvenny'x sredstv. Moscow: Grif i K; 2014. (In Russ.).]

4. Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Clinical Pharmacology.* (2020).
 5. *In Vitro* Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Clinical Pharmacology.* (2020).
 6. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005 Jan;21(1):1–26. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.
 7. Шулькин А.В., Транова Ю.С., Абаленихина Ю.В., и др. Клетки линии Caco-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2022;(10):63–69. [Shchulkin AV, Tranova YuS, Abalenikhina YuV, et al. Cells of the Caco-2 line as a model for studying the absorption of medicinal

substances. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;(10):63–69. (In Russ).]. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69.

8. Pilařová V, Gottvald T, Svoboda P, et al. Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum. *Anal Chim Acta*. 2016 Aug 31;934:252–65. DOI: 10.1016/j.aca.2016.06.008.

9. Oliveira DC, Weigh A, Rolim CM. Simple and reliable HPLC analysis of fexofenadine hydrochloride in tablets and its application to dissolution studies. *Pharmazie*. 2007 Feb;62(2):96–100.

10. Мыльников П.Ю., Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М., Якушева Е.Н. ВЭЖХ-методика количественного анализа фексофенадина в печени кроликов. *Фармация и фармакология*. 2020;8(1):40–47. [Myl'nikov PYu, Chernykh IV, Shchulkin AV, Popova NM, Yakusheva EN. HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in rabbits' liver. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(1):40–47. (In Russ).]. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-1-40-47.

11. Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., Гацаного М.В. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в плазме крови. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;(2):35–38. [Yakusheva EN, Chernykh IV, Shulkin AV, Gatsanoga MV. Design of HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in blood plasma. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(2):35–38. (In Russ).].

12. İşleyen EAÖ, Özden T, Özilhan S, Toptan S. Quantitative determination of fexofenadine in human plasma by HPLC-MS. *Chromatographia*. 2007;(66):109–113. DOI: 10.1365/s10337-007-0267-x.

13. Zhao R, Kalvass JC, Yanni SB, Bridges AS, Pollack GM. Fexofenadine brain exposure and the influence of blood-brain barrier P-glycoprotein after fexofenadine and terfenadine administration. *Drug Metab Dispos*. 2009 Mar;37(3):529–35. DOI: 10.1124/dmd.107.019893.

14. Flynn CA, Alnouti Y, Reed GA. Quantification of the transporter substrate fexofenadine in cell lysates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011 Aug 30;25(16):2361–6. DOI: 10.1002/rcm.5111.