

УДК 615.356:615.322].074:543.544

<https://doi.org/10.23888/HMJ2022103251-258>

Метод количественного определения кверцетина с помощью ВЭЖХ-МС/МС

Ю. Транова[✉], П. Ю. Мыльников, А. В. Щулькин, И. В. Черных, С. К. Правкин, Е. Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Российской Федерации

Автор, ответственный за переписку: Транова Юлия, yulyatran@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Введение. Белок устойчивости к раку молочной железы человека (BCRP, ABCG2) — транспортный белок суперсемейства ABC транспортеров, использующий энергию АТФ для своей работы. BCRP играет важную роль в фармакокинетике, поэтому новые лекарственные вещества рекомендуется тестировать на принадлежность к его субстратам, индукторам и ингибиторам. Оценку влияния веществ на активность данного белка-транспортера *in vitro* проводят по изменению трансмембранного переноса его субстратов, одним из которых является кверцетин. Это, в свою очередь, требует разработки и валидации метода его количественного анализа в соответствующей матрице.

Цель. Разработка метода количественного определения кверцетина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с tandemным масс-селективным детектированием (МС/МС) и выполнении его полной валидации.

Материалы и методы. Метод разрабатывали на ВЭЖХ «Ultimate 3000», оснащенном МС/МС детектором TSQ Fortis («Thermo Fisher», США). Для проведения хроматографического анализа использовали колонку UCT Selectra C18 4,6 мм × 100 мм × 5 мкм, 100 А, предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM. Время анализа составляло 11 мин при температуре разделения 35°C, скорости потока подвижной фазы 0,5 мл/мин и объеме вводимой пробы 5 мкл. Применяли градиентный режим элюирования: соотношение 0,1%-ного раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила составило: на 0 мин 70% и 30%; 0,3 мин — 30% и 70%; 4 мин — 1% и 99%; 9 мин — 70% и 30%. Время удерживания кверцетина соответствовало 3,91 мин. Условия детектирования были следующими: негативный режим ионизации, мониторинг множественных реакций 301 m/z → 150,9 m/z при энергии столкновения 22 В и 301 m/z → 178,9 m/z при энергии столкновения 17 В, фрагментация источника 5 В, напряжение электроспрея 3000 В, давление CID-газа 1 mTorr, Sheath gas 50 Arb, Aux gas 10 Arb, Sweep gas 10 Arb, температура трубки для переноса ионов 300°C, температура испарителя 350°C. Матрицей служила транспортная среда после инкубации в течение 3 часов с клетками линии Сасо-2, гиперэкспрессирующими BCRP. В указанной среде в дальнейшем будет оцениваться транспорт кверцетина через клеточный монослой *in vitro*. Осаждение белка и выделение кверцетина из транспортной среды осуществляли смесью воды и ацетонитрила в соотношении 1:1.

Результаты. Разработанный метод был валидирован по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, матричный эффект, стабильность образцов. Аналитический диапазон методики находился в диапазоне 5–500 нмоль/л. Коэффициент корреляции составлял более 0,99. Предел обнаружения и нижний предел количественного определения кверцетина (НПКО) соответствовали 1 и 5 нмоль/л. Расчет внутри- и межцикловой точности и прецизионности показал, что данные параметры для НПКО не превышают 20 и 15% — для остальных концентраций. Стабильность аналита продемонстрирована при трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C, при хранении при -80°C в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождения в течение 24 ч в автосемплере. Перенос пробы и матричный эффект отсутствовали.

Выводы. Разработан метод количественного определения кверцетина с помощью ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде и выполнена его полная валидация.

Ключевые слова: кверцетин; ВЭЖХ-МС/МС; BCRP

Для цитирования:

Транова Ю., Мыльников П. Ю., Щулькин А. В., Черных И. В., Правкин С. К., Якушева Е. Н. Метод количественного определения кверцетина с помощью ВЭЖХ-МС/МС // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2022. Т. 10, № 3. С. 251–258. <https://doi.org/10.23888/HMJ2022103251-258>.

<https://doi.org/10.23888/HMJ2022103251-258>

Method for quantitative quercetin detection using HPLC-MS/MS

Yuliya Tranova✉, Pavel Yu. Myl'nikov, Aleksey V. Shchul'kin, Ivan V. Chernykh, Sergey K. Pravkin, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Corresponding author: Yuliya Tranova, yulyatran@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION: Human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) is a transport protein of ABC superfamily of transporters that uses ATP energy for its work. BCRP plays an important role in the pharmacokinetics of drugs, therefore all new drugs are recommended to be tested for belonging to its substrates, inducers and inhibitors. The influence of substances on the activity of this transport protein *in vitro* is evaluated by a change of transmembrane transfer of its substrates, one of which being quercetin. This, in turn, requires the development and validation of a method for its quantitative analysis in an appropriate matrix.

AIM: To develop a method for the quantitative determination of quercetin using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass selective detection (MS/MS) with full validation.

MATERIALS AND METHODS: The method was developed on Ultimate 3000 HPLC equipped with TSQ Fortis (Thermo Fisher, USA) MS/MS detector. The conditions of chromatographic analysis were as follows: column UCT Selectra C18 4.6 mm*100 mm 5µm, 100 Å, Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM. The analysis time was 11 min at separation temperature 35°C, flow rate 0.5 ml/min, injected sample volume 5 µl. Gradient elution regime was used: on 0th minute, the ratio of 0.1% formic acid solution and acetonitrile was 70% and 30%; 0.3 min — 30% and 70%; 4 min — 1% and 99%; 9 min — 70% and 30%. Quercetin retention time was 3.91 minutes. Detection conditions: negative ionization mode, 301 m/z → 150.9 m/z with collision energy 22 V, 301 m/z → 178.9 m/z with collision energy 17 V, source fragmentation 5 V, electrospray voltage 3 000 V, CID gas pressure 1 mTorr, Sheath gas 50 Arb, Aux gas 10 Arb, Sweep gas 10 Arb, ion transfer tube temperature 300°C, vaporizer temperature 350°C. The matrix was transport medium after incubation for 3 hours with Caco-2 cells overexpressing BCRP. In this medium, the transport of quercetin through the cell monolayer was further evaluated *in vitro*. Precipitation of protein and isolation of quercetin from the transport medium was realized by a mixture of water and acetonitrile in a ratio of 1:1.

RESULTS: The developed method was validated by the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification, sample transfer, matrix effect, sample stability. The analytical range of the technique was 5–500 nmol/l. In this case, the correlation coefficient was more than 0.99. The limit of detection and the lower limit of quantification of quercetin (LLQQ) were 1 and 5 nmol/l, respectively. The calculation of intra- and inter-cycle accuracy and precision showed that these parameters do not exceed 20% for the concentration corresponding to the lower limit of quantitative determination, and 15% for other concentrations. The analyte demonstrated stability in triple freeze-defreeze cycle at -80°C, in storage at -80°C for 60 days, after sample preparation and being kept in the autosampler for 24 hours. There was no sample transfer and no matrix effect.

CONCLUSION: A method for the quantitative determination of quercetin using HPLC-MS/MS in a transport medium was developed and fully validated.

Keywords: *quercetin; HPLC-MS/MS; BCRP*

For citation:

Tranova Yu., Myl'nikov P. Yu., Shchul'kin A. V., Chernykh I. V., Pravkin S. K., Yakusheva E. N. Method for quantitative quercetin detection using HPLC-MS/MS. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2022;10(3):251–258. <https://doi.org/10.23888/HMJ2022103251-258>.

Введение

Эффлюксные транспортные белки играют важную роль в процессах всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ из организма. Их индукция или ингибирование существенно изменяет фармакокинетику веществ, являющихся субстратами транспортных белков, что может привести к снижению фармакологического эффекта или симптомам относительной передозировки [1].

В США и Европе для повышения безопасности фармакотерапии новые лекарственные препараты рекомендуется тестировать на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам клинически значимых белков-транспортёров, в том числе белка устойчивости к раку молочной железы (BCRP). На начальных этапах исследования активность транспортера оценивают *in vitro* — на клетках, экспрессирующих данный белок, а затем, при необходимости, *in vivo* — на добровольцах [2].

BCRP (ABCG2) является членом подсемейства G-белков суперсемейства ABC-транспортёров. Данный белок экспрессируется в синцитиотрофобластах плаценты человека, в апикальной мембране энтероцитов, в мембранах гепатоцитов, на поверхности эндотелия сосудов головного мозга, в клетках яичников, надпочечников и легких [3].

На данный момент известно более 200 субстратов BCRP, но не установлено точной связи между структурой вещества и его субстратной принадлежностью. Первоначально в качестве субстратов BCRP были установлены противоопухолевые средства, такие как метотрексат, митоксантрон, топотекан, иринотекан, флавопиридол, иматиниб и др. Однако другие классы противоопухолевых препаратов, включая винбластин, цисплатин и паклитаксел не являются его субстратами. Субстратная специфичность BCRP не ограничивается противоопухолевыми средствами: транспортер контролирует фармакокинетику празозина, глибурида, циметидина, сульфасалазина, нитрофурантоина, розувастатина, порфиринов, флавоноидов и т. д. [3]. Таким образом, широкий спектр субстра-

тов и вариабельность активности BCRP требует разработки и апробации методов изучения его функциональной активности с целью проведения эффективной и безопасной фармакотерапии и прогнозирования возможных фармакокинетических взаимодействий на его уровне.

Для оценки активности BCRP в качестве субстрата было предложено анализировать трансмембранный перенос кверцетина — низкотоксичного вещества группы флавоноидов природного происхождения, относящегося к препаратам витамина Р. Испытания *in vitro* выполняют на клетках линии Сасо-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека) после их 21-дневного инкубирования на полупроницаемой мембране трансвелл-системы. Данная культура в указанных условиях приобретает морфологическое и функциональное сходство с энтероцитами человека, гиперэкспрессирующими BCRP и гликопротеин-Р [4–6]. Изучение транспорта кверцетина требует разработки и валидации метода количественного анализа вещества в соответствующей матрице.

Цель. Разработка метода количественного определения кверцетина в транспортной среде клеток линии Сасо-2 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с tandemным масс-селективным детектированием (МС/МС) и выполнении его полной валидации.

Материалы и методы

В исследовании использовали субстанцию кверцетина («Sigma-Aldrich», Германия). Структурная формула кверцетина и основные пути фрагментации его молекулы представлены на рисунке 1.

Работа была выполнена на ВЭЖХ «Ultimate 3000» с градиентным насосом, дегазатором, автосемплером, УФ-детектором и МС/МС детектором TSQ Fortis («Thermo Fisher», США). Управление системой ВЭЖХ-МС/МС и анализ данных проводили с помощью программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Использовали следующие реактивы: вода ВЭЖХ-МС («Panreac», Испания), ки-

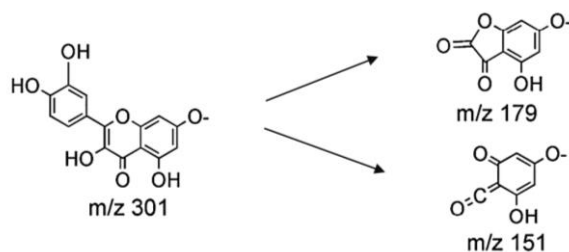


Рис. 1. Структурная формула кверцетина и детектируемые продукты его фрагментации.

слота муравьиная 98% для аналитики («Panreac», Испания), ацетонитрил для UV-IR-HPLC («Panreac», Испания).

Применялись следующие условия хроматографирования: Колонка UCT Selectra C18 4,6 мм × 100 мм 5 мкм, 100А, предколонка — Selectra C18 Guard

Cartridges SLC-18 GDC46-5UM, время анализа — 11 мин, температура разделения 35°C, скорость потока подвижной фазы — 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы — 5 мкл.

Элюирование проводили в градиентном режиме по следующей программе (табл. 1).

Таблица 1. Соотношение компонентов подвижной фазы

Время анализа	Кислота муравьиная 0,1%-ный раствор	Ацетонитрил
0,0 мин	70%	30%
0,3 мин	30%	70%
4,0 мин	1%	99%
9,0 мин	70%	30%

При данных условиях время удерживания кверцетина составило 3,91 мин.

Ионизацию молекул проводили в негативном режиме методом электроспрея (напряжение 3000 В).

Условия детектирования: Sheath gas 50 Arb, Aux gas 10 Arb, Sweep gas 10 Arb, давление CID-газа 1 мТорр, температура трубки для переноса ионов 300°C, температура испарителя 350°C.

Режим детектирования кверцетина — мониторинг множественных реакций, 301 m/z → 150,9 m/z при энергии столкновения 22 В и 301 m/z → 178,9 m/z при энергии столкновения 17 В, фрагментация источника 5 В.

Матрицей являлась транспортная среда, представляющая собой раствор Хэнкса с 25 мМ Хепес и 1% диметилсульфоксида, после инкубации с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч. Осаждение белка и выделение кверцетина из транспортной среды осуществляли смесью воды и ацетонитрила в соотношении 1:1. Для этого к 50 мкл образца транспортной среды добавляли 950 мкл указанной смеси, тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия),

после чего центрифугировали в течение 10 мин при 13000 g на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США). Надосадочную жидкость переносили в вials и помещали в автосемплер.

Приготовление матричного и калибровочных растворов. 2,6 мг кверцетина растворяли в 2,6 мл метанола для получения раствора с концентрацией 1,0 мг/мл (3333 мкмоль/л), затем к 0,15 мл полученного раствора добавляли 9,85 мл метанола для получения матричного раствора с концентрацией 50 мкмоль/л. Из него путем разведения в метаноле готовили 7 рабочих растворов в объеме 10 мл с концентрациями 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 и 5000 нмоль/л. Матричный и рабочие растворы хранили при температуре -80°C.

Путем добавления к матрице равных объемов рабочих растворов были приготовлены калибровочные растворы кверцетина следующих концентраций: 5, 10, 20, 50, 100, 200 и 500 нмоль/л. Диапазон концентраций целевого вещества был выбран на основе ожидаемых значений при проведении транспортного эксперимента на клетках линии Сасо-2.

Валидация. Валидацию биоаналитического метода проводили на основе Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (2016), а также Руководств FDA 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 (2018) и EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London (2011) по следующим параметрам [7–9]:

- селективность;
- градуировочная кривая (линейность);

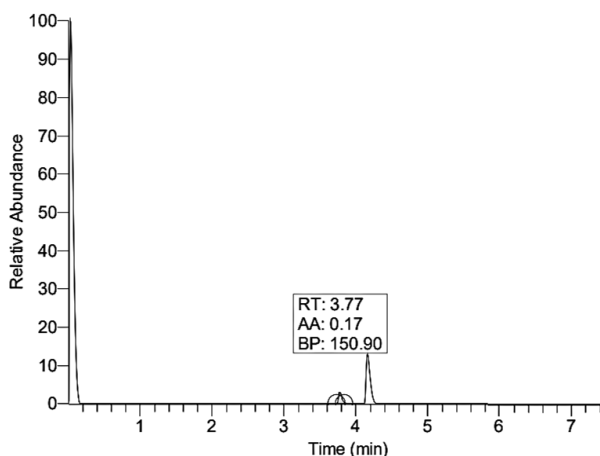


Рис. 2. Хроматограмма холостой матрицы.

Предел обнаружения кверцетина в матрице с помощью разработанного метода составил 1 нмоль/л, при этом соотношение сигнала к шуму было не менее 3.

Нижний предел количественного определения (НПКО) кверцетина составил 5 нмоль/л. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20%.

Градуировочная кривая. Проводили анализ 7 образцов холостой матрицы с добавлением равных объемов рабочих растворов кверцетина до получения концентраций целевого вещества 5, 10, 20, 50,

- нижний предел количественного определения;

- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);

- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);

- перенос пробы;

- матричный эффект;

- стабильность образцов.

Результаты и их обсуждение

Селективность. Выполняли анализ холостой матрицы без добавления стандарта кверцетина и матрицы с добавлением кверцетина до конечной концентрации 5 нмоль/л. На хроматограммах образцов холостой матрицы не фиксировались пики со временем удерживания, соответствующим времени удерживания кверцетина (рис. 2, 3).

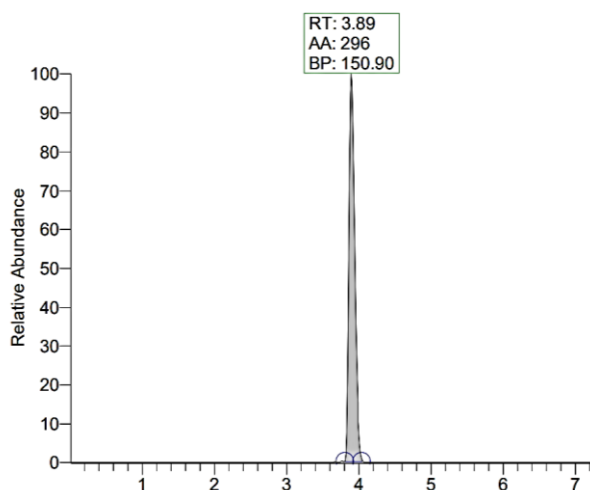


Рис. 3. Хроматограмма матрицы с добавлением стандарта кверцетина до конечной концентрации 5 нмоль/л.

100, 200 и 500 нмоль/л. По полученным значениям строили 3 градуировочные кривые в координатах площадь пика кверцетина–концентрация кверцетина (образец графика 1 приведен на рис. 4). Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y = 31,0517 + 65,1779 \cdot x$, $R^2 = 0,9987$, $W = 1/x$; $y = 25,6809 + 35,643 \cdot x$, $R^2 = 0,9960$, $W = 1/x$; $y = -77,6652 + 58,3289 \cdot x$, $R^2 = 0,9947$, $W = 1/x$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99).

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по урав-

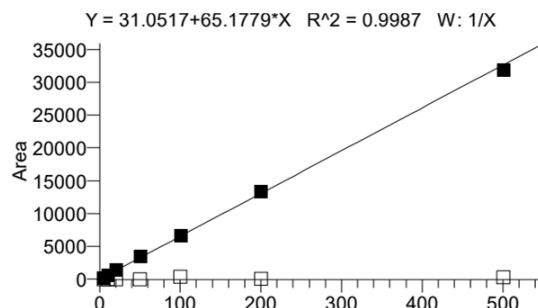


Рис. 4. График 1 зависимости «площадь пика кверцетина–концентрация кверцетина».

нению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 2.

Точность и прецизионность. Проводили анализ растворов контролей качества кверцетина с концентрациями 5, 20, 200 и 400 нмоль/л в рамках трех циклов. Прецизионность (относительное стандартное отклонение) и точность (относи-

тельная погрешность) оценивали внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации кверцетина. Далее тестировали прецизионность и точность между циклами. Полученные величины соответствовали принятым нормам (не более 20% для НПКО и не более 15% — для остальных точек) (табл. 3, 4).

Таблица 2. Отклонения концентраций кверцетина в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нмоль/л	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Концентрация рассчитанная нмоль/л	Точность, %	Концентрация рассчитанная нмоль/л	Точность, %
5	4,1	17,6	5,4	8,6	5,2	4,3
10	10,0	0,5	9,0	14,0	11,1	11,0
20	22,5	12,3	17,9	10,4	21,7	8,4
50	53,0	6,1	54,0	8,0	43,9	12,2
100	101,6	1,6	104,2	4,2	88,1	11,9
200	204,9	2,4	215,6	7,8	204,9	2,4
500	489,2	2,2	479,2	4,2	514,1	2,8

Таблица 3. Точность и прецизионность методики количественного определения кверцетина в транспортной среде внутри цикла

Концентрация номинальная, нмоль/л	Концентрация рассчитанная нмоль/л	Точность, %	Концентрация средняя, нмоль/л	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
5	4,1	18,6	5,5	10,4	0,8	14,5
	6,0	19,3				
	5,8	15,8				
	5,9	18,1				
	5,8	16,2				
20	21,4	7,1	22,1	10,5	0,5	2,3
	22,3	11,6				
	22,2	10,8				
	22,6	13,1				
	21,9	9,4				
200	214,5	7,2	208,8	4,4	14,3	6,8
	193,9	3,0				
	224,0	12,0				
	218,5	9,2				
	193,1	3,4				
400	429,5	7,4	433,9	8,5	20,1	4,6
	435,9	9,0				
	402,5	0,6				
	447,6	11,9				
	454,2	13,55				

Таблица 4. Точность и прецизионность методики количественного определения кверцетина в транспортной среде между циклами

Концентрация номинальная, нмоль/л	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Концентрация средняя, нмоль/л	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
5	5,5	10,2	5,6	12,0	0,3	5,4
	5,3	6,3				
	5,8	16,6				
20	22,1	10,4	21,8	9,0	0,4	1,8
	21,9	9,4				
	21,4	6,8				
200	208,8	4,4	210,6	5,3	5,8	2,8
	205,9	2,9				
	217,0	8,5				
400	433,9	8,5	441,4	10,4	7,9	1,8
	449,6	12,4				
	440,6	10,2				

Стабильность. Стабильность матричного раствора кверцетина анализировалась при его хранении при -80°C в течение 60 суток. Стабильность растворов кверцетина в концентрациях 20 и 400 нмоль/л в матрице оценивалась при трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C , при хранении при -80°C в течение 60 суток, после пробоподготовки и нахождения в течение 24 ч в автосемплере. Анализировали по 3 образца для каждой концентрации и каждого вида стабильности.

Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы с концентрацией кверцетина 500 нмоль/л в матрице и образца чистой матрицы на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина.

Матричный эффект. Определяли отношения площади пиков образцов с до-

бавлением кверцетина до концентраций 20 и 400 нмоль/л в матрице к площади пиков аналита в метаноле. Относительное стандартное отклонение отношения площадей пиков, рассчитанное для 6 образцов, не превышало 15%.

Заключение

Разработан метод количественного определения кверцетина в транспортной среде клеток линии Сасо-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Данный метод был валидирован по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, матричный эффект, стабильность. Аналитический диапазон методики составил 5–500 нмоль/л, что позволяет применять ее для оценки концентрации кверцетина при изучении влияния тестируемых веществ на активность транспортного белка BCRP *in vitro*.

Список источников

1. Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., и др. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015. № 3. С. 49–53.
2. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter — Mediated Drug Interactions. Guidance for Industry. Доступно по: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/in-vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>. Ссылка активна на 22.02.2022.
3. Mao Q., Unadkat J.D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport // The AAPS Journal. 2005. Vol. 7, № 1. P. E118–E133. doi: 10.1208/aapsj070112
4. Chen Z.-S., Robey R.W., Belinsky M.G., et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport // Cancer Research. 2003. Vol. 63, № 14. P. 4048–4054.
5. Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa // Pharmaceutical Research. 1990. Vol. 7, № 9. P. 902–910.

doi: [10.1023/a:1015937605100](https://doi.org/10.1023/a:1015937605100)

6. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., и др. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-P in vitro // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2020. Т. 8, № 3. С. 329–336. doi: [10.23888/HMJ202083329-336](https://doi.org/10.23888/HMJ202083329-336)
7. Глава 7. Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2014. Т. I. С. 174–215.

8. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. Доступно по: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Ссылка активна на 22.02.2022.
9. Guideline on bioanalytical method validation. London; 2011. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Ссылка активна на 22.02.2022.

References

1. Yakusheva EN, Chernykh IV, Shulkin AV, et al. Methods of identification of drugs as P-glycoprotein substrates. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2015;(3):49–53. (In Russ).
2. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter — Mediated Drug Interactions. Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/in-vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>. Accessed: 2022 February 22.
3. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *The AAPS Journal*. 2005;7(1):E118–33. doi: [10.1208/aapsj070112](https://doi.org/10.1208/aapsj070112)
4. Chen Z–S, Robey RW, Belinsky MG, et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Research*. 2003;63(14):4048–54.
5. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(9):902–10. doi: [10.1023/a:1015937605100](https://doi.org/10.1023/a:1015937605100)
6. Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, et al. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein in vitro. *Science of the Youth (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(2):133–40. (In Russ). doi: [10.23888/HMJ202083329-336](https://doi.org/10.23888/HMJ202083329-336)
7. Chapter 7. Izucheniye bioekvivalentnosti vosproizvedennykh lekarstvennykh sredstv. In: *Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv*. Moscow: Grif i K; 2014. Vol. I. P. 174–215. (In Russ).
8. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Accessed: 2022 February 22.
9. Guideline on bioanalytical method validation. London; 2011. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed: 2022 February 22.

Дополнительная информация

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Информация об авторах:

Транова Юлия — очный аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, SPIN: 2732-8760, <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>, e-mail: yulyatran@gmail.com

Мыльников Павел Юрьевич — ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, SPIN: 8503-3082, <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>, e-mail: dukeviperlr@gmail.com

Шулькин Алексей Владимирович — д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, SPIN: 2754-1702, <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>, e-mail: alekseyschulkin@rambler.ru

Черных Иван Владимирович — к.б.н. доцент, зав. кафедрой фармацевтической химии, SPIN: 5238-6165, <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>, e-mail: ivchernykh88@mail.ru

Правкин Сергей Константинович — к.м.н., доцент, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, SPIN: 3672-6695, <https://orcid.org/0000-0002-2088-6350>, e-mail: psco@mail.ru

Якушева Елена Николаевна — д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО, SPIN: 2865-3080, <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>, e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Вклад авторов:

Авторы внесли равный вклад в концепцию, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The authors declare no funding for the study.

Information about the authors:

Yulia Tranova — Graduate Student of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of CPEF, SPIN: 2732-8760, <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>, e-mail: yulyatran@gmail.com

Pavel Yu. Mylnikov — Assistant of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty, SPIN: 8503-3082, <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>, e-mail: dukeviperlr@gmail.com

Alexey V. Shchulkin — MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of CPEF, SPIN: 2754-1702, <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>, e-mail: alekseyschulkin@rambler.ru

Ivan V. Chernykh — MD, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, SPIN: 5238-6165, <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>, e-mail: ivchernykh88@mail.ru

Sergey K. Pravkin — MD, Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Assistant Professor of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of CPEF, SPIN: 3672-6695, <https://orcid.org/0000-0002-2088-6350>, e-mail: psco@mail.ru

Elena N. Yakusheva — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of CPEF, SPIN: 2865-3080, <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>, e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Contribution of the authors:

All authors made an equal contribution to the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Рукопись получена: 22.02.2022
Received: 22.02.2022

Рукопись одобрена: 01.09.2022
Accepted: 01.09.2022

Опубликована: 30.09.2022
Published: 30.09.2022