

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752>
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

П. К. Карнакова¹✉, Т. Н. Комаров^{1, 2}, О. А. Арчакова¹, Д. Ю. Ивкин³,
Е. С. Ветрова¹, И. И. Тернинко³, И. Е. Шохин^{1, 2}, И. А. Наркевич³

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Карнакова Полина Константиновна. E-mail: p.karnakova@cpha.ru

ORCID: П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>;

О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Е. С. Ветрова – <https://orcid.org/0000-0003-2219-5964>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 19.01.2024

Статья принята в печать: 26.02.2024

Статья опубликована: 26.02.2024

Резюме

Введение. Этмабен – перспективный препарат для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, тщательно изученный в ходе полного цикла доклинических исследований. Для проведения I фазы клинических исследований (КИ) необходимо разработать биоаналитическую методику, позволяющую количественно определять этмабен в плазме крови человека.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для последующего проведения фармакокинетического исследования.

Материалы и методы. Определение этмабена в плазме крови человека проводилось на хроматографе Nexera XR с масс-селективным детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Пробоподготовка осуществлялась путем осаждения белков ацетонитрилом. Внутренний стандарт: прометазин. Колонка: Luna C18, 100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм. Элюирование проводилось в градиентном режиме при скорости потока 1,00 мл/мин. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А), 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Время удерживания этмабена и прометазина около 1,18 и 1,15 мин соответственно. Общее время регистрации хроматограммы: 4,00 мин. Метод и режим ионизации: электроспрей; отрицательный режим для этмабена, положительный – для прометазина. Детектирование на масс-спектрометрическом детекторе осуществлялось путем мониторинга MRM-переходов (Multiple Reaction Monitoring): 249,90 → 92,15 m/z; 249,90 → 160,20 m/z (этмабен); 284,95 → 197,95 m/z (прометазин).

Результаты и обсуждение. Была проведена разработка первой методики определения этмабена в плазме крови человека, а также ее полная и частичная валидация согласно действующим требованиям нормативной документации.

Заключение. Разработана и валидирована методика определения этмабена в плазме крови человека с подтвержденным аналитическим диапазоном 0,250–30,000 мкг/мл. Подтвержденный аналитический диапазон методики по результатам частичной валидации составил 0,040–35,000 мкг/мл. Методика была успешно апробирована при проведении I фазы КИ и может применяться для других фармакокинетических исследований этмабена.

Ключевые слова: этмабен, ВЭЖХ-МС/МС, разработка, валидация, плазма крови, количественное определение, фармакокинетика

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

Вклад авторов. П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Е. С. Ветрова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, а также в проведении аналитической части исследования. Д. Ю. Ивкин, И. И. Тернинко выполняли консультативную работу. И. Е. Шохин, И. А. Наркевич отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Ивкин Д. Ю., Ветрова Е. С., Тернинко И. И., Шохин И. Е., Наркевич И. А. Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):257–271. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752>

Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Quantitative Determination of Etmafen in Human Blood Plasma

Polina K. Karnakova¹✉, Timofey N. Komarov^{1, 2}, Olga A. Archakova¹, Dmitry Yu. Ivkin³,
Evgeniya S. Vetrova¹, Inna I. Terninko³, Igor E. Shohin^{1, 2}, Igor A. Narkevich³

¹ LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

³ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ Corresponding author: Polina K. Karnakova. E-mail: p.karnakova@cpha.ru

© Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Ивкин Д. Ю., Ветрова Е. С., Тернинко И. И., Шохин И. Е., Наркевич И. А., 2024

© Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Ivkin D. Yu., Vetrova E. S., Terninko I. I., Shohin I. E., Narkevich I. A., 2024

ORCID: Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>;
Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dmitry Yu. Ivkin – <http://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;
Evgeniya S. Vetrova – <http://orcid.org/0000-0003-2219-5964>; Inna I. Terninko – <http://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Igor A. Narkevich – <http://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 19.01.2024

Revised: 26.02.2024

Published: 26.02.2024

Abstract

Introduction. Etmaben is a promising drug for the treatment of cardiovascular diseases, widely studied in preclinical studies. In order to conduct phase I clinical trials, it is necessary to develop a bioanalytical method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma.

Aim. The aim of the study is to develop and validate a method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS) for the pharmacokinetic study.

Materials and methods. The determination of etmaben in human blood plasma was carried out on a Nexera XR chromatograph with a mass-selective detector LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Japan). Sample preparation: precipitation with acetonitrile. Internal standard: promethazine. Column: Luna C18, 100 Å, 50 × 2.00 mm, 5 µm. Elution in gradient mode at a flow rate of 1.00 mL/min. Mobile phase: 0.1 % formic acid solution in water (eluent A), 0.1 % formic acid solution in acetonitrile (eluent B). Retention time for etmaben and promethazine is approximately 1.18 min and 1.15 min, respectively. Total chromatogram registration time: 4.00 min. Ionization method and mode: electrospray; negative mode for etmaben, positive mode for promethazine. Detection was carried out in the mode of multiple reaction monitoring (MRM): 249.90 → 92.15 m/z; 249.90 → 160.20 m/z (etmaben); 284.95 → 197.95 m/z (promethazine).

Results and discussion. We have developed, for the first time, a method for determining etmaben and performed its full and partial validation according to current regulatory requirements.

Conclusion. The method for determining etmaben in human blood plasma with a confirmed analytical range of 0.250–30.000 µg/mL has been developed and validated. The confirmed analytical range of the method based on the results of the partial validation was 0.040–35.000 µg/mL. The method was successfully applied in phase I clinical trials and can be used for other pharmacokinetic studies of etmaben.

Keywords: etmaben, HPLC-MS/MS, development, validation, blood plasma, quantitative determination, pharmacokinetics

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Polina K. Karnakova, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Evgeniya S. Vetrova were involved in the development and validation of the bioanalytical method as well as in conducting the analytical part of the study. Dmitry Yu. Ivkin, Inna I. Terninko provided consulting work. Igor E. Shohin, Igor A. Narkevich were responsible for the organizational aspects of the study. All of the mentioned authors participated in the discussion of the obtained results in the form of a scientific discussion.

For citation: Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Ivkin D. Yu., Vetrova E. S., Terninko I. I., Shohin I. E., Narkevich I. A. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):257–271. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752>

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей угрозой для здоровья населения во всех странах мира, включая Россию [1–3]. Ежегодно фиксируется более чем 17,9 млн смертей от ССЗ и прогнозируется, что к 2030 году смертность возрастет до 22,3 млн [4, 5]. Одно из основных клинических проявлений ССЗ – ишемическая болезнь сердца (ИБС), которая считается главной причиной инвалидности и смертности среди всех ССЗ, а также оказывает значительную нагрузку на систему здравоохранения [6–8]. Общее число летальных исходов от ИБС продолжает увеличиваться, что может быть связано с недостаточно эффективной и нерационально подобранной терапией данного заболевания [5, 8]. В связи с этим одной из наиболее приоритетных задач современной медицинской науки является поиск и создание новых лекарственных средств с кардиотропной активностью, применяемых для лечения ИБС [9].

Ишемическая болезнь сердца возникает вследствие нарушения баланса между потребностью миокарда в кислороде и его реальным кровоснабжением, что приводит к развитию гипоксии миокарда. При гипоксии миокарда снижается синтез молекул аденозинтрифосфата, который в норме синтезируется в митохондриях кардиомиоцитов в результате окислительных реакций и является основным энергетическим субстратом кардиомиоцитов, происходит снижение окисления глюкозы, повышение использования свободных жирных кислот (СЖК) и усиление процессов свободнорадикального окисления, вызывающих окислительный стресс. Данные процессы оказывают негативное воздействие на кардиомиоциты и приводят к их гибели [9–12].

Одним из наиболее перспективных способов лечения ИБС считается применение препаратов, воздействующих на внутриклеточные биохимические процессы: регулирование и восстановление энергетических процессов в клетках путем оптимизации использования кислорода миокардом за счет

усиления аэробного гликолиза и уменьшения интенсивности окисления СЖК, нивелирования последствий окислительного стресса и снижения потребности в кислороде. Для данной цели применяются препараты, которые наряду с антиангинальным действием имеют антиоксидантные и антигипоксиксические эффекты и обеспечивают нормальное функционирование кардиомиоцитов в условиях сохраняющейся гипоксии [11, 13–15].

В исследованиях по изучению активности производных малоновой кислоты было спрогнозировано и обнаружено их выраженное антигипоксическое действие, что открывает новые возможности для создания инновационных препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [15, 16]. Одним из активно изучаемых производных малоновой кислоты является этмабен (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота), впервые синтезированный на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ) [17, 18]. Синтез этмабена происходит при взаимодействии диэтилового эфира малоновой кислоты с пара-аминобензойной кислотой при нагревании в присутствии органического растворителя толуола или *о*-ксилола [17]. Схема синтеза этмабена представлена на рисунке 1.

Этмабен является инновационным лекарственным средством с антиишемической и антиоксидантной активностью. Учитывая способность этмабена снижать интенсивность окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной функции, а также оказывать влияние на гликолиз и окислительное фосфорилирование, этмабен может применяться для лечения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности [15, 19]. На данный момент этмабен имеет запатентованные схемы синтеза [17], отработанные технологии получения фармацевтических композиций и готовых лекарственных

форм [20, 21], а также положительные результаты доклинических исследований [15, 19, 22–25].

Исследователями из СПХФУ было изучено влияние этмабена на формирование экспериментальной постинфарктной хронической сердечной недостаточности и доказана кардиотропная активность на модели хронической сердечной недостаточности [19]. Был проведен полный цикл доклинических исследований этмабена, включающий оценку эффективности и безопасности этмабена, а также изучение его потенциального механизма действия и фармакологических эффектов. Были доказаны положительные профили безопасности активной фармацевтической субстанции (АФС) и готовой лекарственной формы этмабена, изучена фармакологическая безопасность фармацевтической субстанции этмабена и определены основные фармакокинетические и фармакодинамические параметры на грызунах и негрызунах при различных путях введения [22–25]. Был проведен полный цикл фармацевтической разработки, включая разработку методик для определения родственных примесей этмабена [18, 26]. Следующим этапом разработки является проведение I фазы клинических исследований (КИ). Ранее было получено разрешение на проведение I фазы КИ № 733 от 28.12.2022 («Этмабен, 300 мг», таблетки, покрытые оболочкой). Далее для проведения аналитического этапа КИ необходимо провести разработку и валидацию бионалитической методики, пригодной для количественного определения этмабена в плазме крови человека.

Таким образом, целью данного исследования является проведение разработки и валидации методики количественного определения этмабена в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшей апробации и использования при проведении аналитического этапа I фазы КИ.

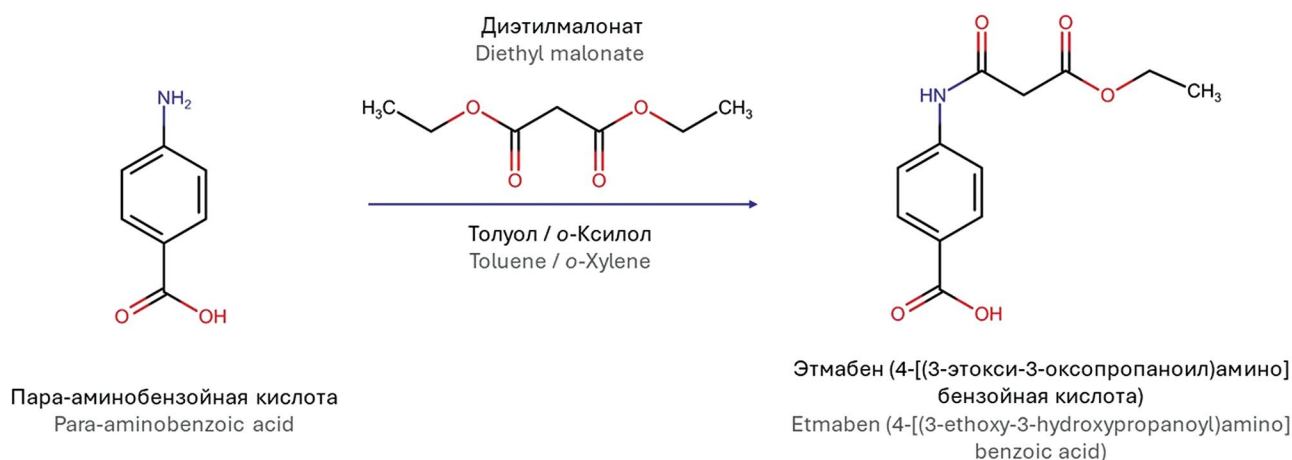


Рисунок 1. Схема синтеза этмабена

Figure 1. Scheme of etmaiben synthesis

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы, стандартные образцы
и биоматериалы

При проведении данного исследования были использованы следующие реактивы: метанол (класс «ос.ч.» для градиентной ВЭЖХ», ООО ТД «ХИММЕД», Россия), ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия; класс «HPLC-S Gradient Grade», Biosolve Chimie, Франция), муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReas, Германия, AppliChem, Испания), вода деминерализованная I класса, полученная с помощью системы очистки воды Hydrolab R5 (Польша).

Были использованы следующие стандартные образцы (СО): этмабен (количественное содержание 99,50 %, Отдел синтеза ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России, Россия), прометазина гидрохлорид (количественное содержание 99,90 %, USP Reference Standard, Франция).

Для приготовления валидационных образцов, калибровочных образцов и образцов контроля качества была использована интактная плазма крови без содержания аналита и внутреннего стандарта (ВС).

Приготовление исходных
и рабочих растворов

При проведении исследования были приготовлены следующие растворы:

- Исходные стандартные раствора этмабена. Для этого точную навеску СО этмабена растворяли в метаноле до получения раствора с концентрацией 1000,000 мкг/мл.
- Рабочие стандартные растворы этмабена. Для этого исходные стандартные растворы этмабена разводили метанолом до получения концентраций, соответствующих калибровочным образцам № 1–8 и уровням контроля качества (КК) LLOQ (нижний предел количественного определения, НПКО [lower limit of quantification]), L (низкий [low]), M1, M2 (средний [middle]), Н (высокий, [high]) – для оценочного диапазона (серия растворов № 1); калибровочным образцам № 1–9 и уровням КК LLOQ, L, M1, M2, M3, Н – для аналитического диапазона № 1 (серия растворов № 2), а также калибровочным образцам № 1–10 и уровням КК LLOQ, L, M1, M2, M3, M4, Н – для аналитического диапазона № 2 (серия растворов № 3). Концентрации рабочих стандартных растворов этмабена приведены в таблице 1.
- Исходный стандартный раствор прометазина. Для этого точную навеску СО прометазина гидрохлорида растворяли в метаноле до получения концентрации прометазина в растворе 200,00 мкг/мл.
- Рабочий стандартный раствор прометазина. Для этого исходный стандартный раствор прометазина разводили метанолом до получения раствора с концентрацией 21,000 мкг/мл.

Таблица 1. Концентрации этмабена
в рабочих стандартных растворах

Table 1. Concentrations of etmaben
at work standard solutions

Уровень Level	Концентрация этмабена, мкг/мл Etmaben concentration, µg/mL		
	Оценочный диапазон (серия № 1) Estimated range (Series № 1)	Аналитический диапазон № 1 (серия № 2) Analytical range № 1 (Series № 2)	Аналитический диапазон № 2 (серия № 3) Analytical range № 2 (Series № 3)
Калибровочные образцы Calibration levels			
1	0,100	5,000	0,800
2	0,200	10,000	2,000
3	1,000	20,000	10,000
4	2,000	100,000	20,000
5	5,000	200,000	100,000
6	10,000	300,000	200,000
7	20,000	400,000	300,000
8	30,000	500,000	400,000
9	–	600,000	500,000
10	–	–	700,000
Образцы контроля качества Quality control samples			
LLOQ	0,100	5,000	0,800
L	0,300	15,000	2,400
M1	4,500	30,000	3,500
M2	18,000	90,000	35,000
M3	–	360,000	105,000
M4	–	–	420,000
H	24,000	480,000	560,000

Пробоподготовка

Пробоподготовка проводилась согласно схеме, представленной на рисунке 2. Для приготовления модельных образцов (калибровочных образцов и образцов КК) к 190 мкл интактной плазмы крови добавляли по 10 мкл рабочих стандартных растворов этмабена до получения образцов с концентрациями, указанными в таблице 2. В качестве внутреннего стандарта в пробы добавляли по 10 мкл рабочего стандартного раствора прометазина. Осаждение белков плазмы крови проводилось с помощью 400 мкл ацетонитрила. После перемешивания и центрифугирования супернатант переносили в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа, где поддерживалась температура на уровне 20 ± 5 °С.

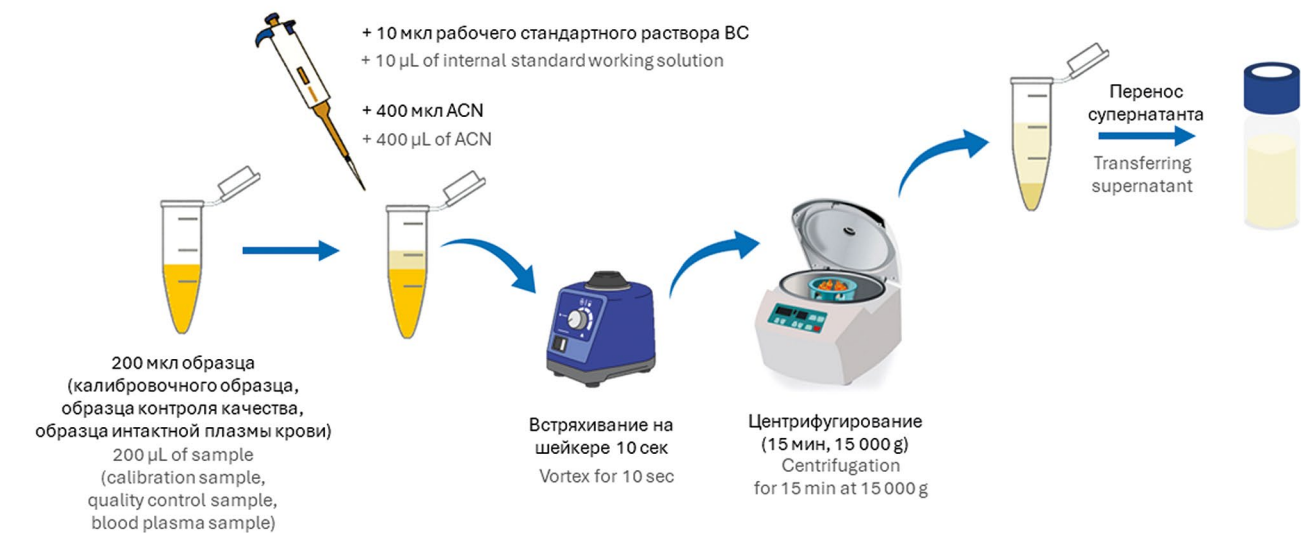


Рисунок 2. Схема пробоподготовки
Figure 2. Scheme of sample preparation

Таблица 2. Концентрации этмабена и прометазина
в калибровочных образцах и образцах контроля качества
Table 2. Concentrations of etmaben and promethazine
at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	Концентрация этмабена, мкг/мл Etmaben concentration, µg/mL			Концентрация прометазина, мкг/мл Promethazine concentration, µg/mL
	Оценочный диапазон (модельные образцы № 1) Estimated range (Samples № 1)	Аналитический диапазон № 1 (модельные образцы № 2) Analytical range № 1 (Samples № 2)	Аналитический диапазон № 2 (модельные образцы № 3) Analytical range № 2 (Samples № 3)	
Калибровочные образцы Calibration levels				
1	0,005	0,250	0,040	1,000
2	0,010	0,500	0,100	1,000
3	0,050	1,000	0,500	1,000
4	0,100	5,000	1,000	1,000
5	0,250	10,000	5,000	1,000
6	0,500	15,000	10,000	1,000
7	1,000	20,000	15,000	1,000
8	1,500	25,000	20,000	1,000
9	–	30,000	25,000	1,000
10	–	–	35,000	1,000
Образцы контроля качества Quality control samples				
LLOQ	0,005	0,250	0,040	1,000
L	0,015	0,750	0,120	1,000
M1	0,225	1,500	0,175	1,000
M2	0,900	4,500	1,750	1,000
M3	–	18,000	5,250	1,000
M4	–	–	21,000	1,000
H	1,200	24,000	28,000	1,000

Хроматографическое разделение
и детектирование

Хроматографическое разделение осуществлялось с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Nexera XR (Shimadzu Corporation, Япония), оборудованного градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, краном переключения линии потока высокого давления. Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось на tandemном масс-селективным детекторе с тройным квадруполем LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Обработка первичных данных проводилась с помощью программного обеспечения LabSolutions ver. 5.91 (Shimadzu Corporation, Япония).

Для хроматографического разделения использовалась колонка Luna C18, 100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) и предколонка SecurityGuard™ C18, 4 × 3,0 мм (Phenomenex, США). Температура термостата колонок поддерживалась на уровне 40 °С.

Элюирование проходило в градиентном режиме при постоянной скорости потока 1,00 мл/мин. В качестве подвижной фазы были использованы следующие элюенты:

- ✓ Элюент А подвижной фазы: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему);
- ✓ Элюент В подвижной фазы: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).

Градиент по составу подвижной фазы представлен в виде диаграммы на рисунке 3. Общее время регистрации хроматограммы: 0,00–4,00 мин. Время удерживания этмабена составило около 1,18 минут, время удерживания прометазина – около 1,15 минут.

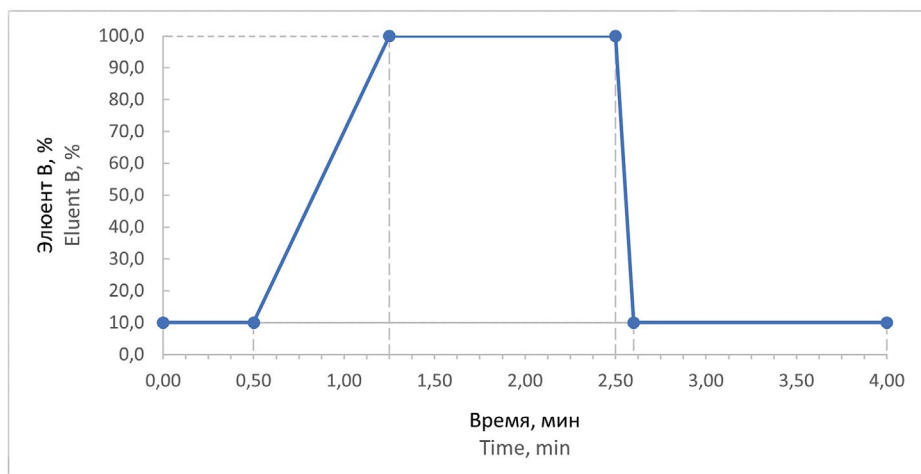


Рисунок 3. Градиент подвижной фазы

Figure 3. Gradient elution

Объем вводимой пробы составил 20 мкл.

Для ионизации вещества был выбран источник ионизации электроспрей (electrospray ionization, ESI). Ионизация этмабена проводилась в отрицательном режиме, прометазина – в положительном режиме. Детектирование проводилось путем мониторинга MRM-переходов (Multiple Reaction Monitoring). Были подобраны следующие MRM-переходы: 249,90 → 92,15 m/z; 249,90 → 160,20 m/z (этмабен); 284,95 → 197,95 m/z (прометазин). Параметры источника ионизации: осушающий газ 20 л/мин, распыляющий газ 3 л/мин, температура линии десольватации 200 °С, температура блока нагрева 400 °С, напряжение на игле ESI –5,0 кВ для этмабена, +4,5 кВ для прометазина.

Валидация аналитической методики

Валидация методики была проведена на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза¹, а также руководств EMA² и FDA³. Была проведена полная и частичная валидация методики. При проведении полной валидации проводилась оценка следующих параметров: калибровочная кривая, точность и прецизионность, ниж-

¹ Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107/> Ссылка активна на 13.01.2024.

² European Medicines Agency. Доступно по: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/> Ссылка активна на 13.01.2024.

³ Food and Drug Administration. Доступно по: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/> Ссылка активна на 13.01.2024.

ний предел количественного определения (НПКО), селективность, пригодность стандартных образцов, эффект матрицы, степень извлечения, перенос пробы, стабильность. При проведении частичной валидации в связи с необходимостью изменения аналитического диапазона методики была проведена оценка параметров: калибровочная кривая, точность и прецизионность, НПКО, селективность.

Калибровочная кривая

Для оценки данного параметра в каждом цикле проводилась оценка калибровочных образцов (см. таблицу 2). Величины относительной погрешности (E , %) должны находиться в диапазоне значений $\pm 20\%$ – для образцов на уровне LLOQ и $\pm 15\%$ – для остальных калибровочных образцов. Данному критерию должны соответствовать не менее 75 % калибровочных образцов не менее чем в шести различных концентрациях.

Точность и прецизионность

Анализировали образцы плазмы крови, соответствующие уровням КК (см. таблицу 2). Анализ проводился в течение пяти последовательностей по пять вводов образца каждого уровня КК. Оценка точности и прецизионности проводилась внутри каждой последовательности, а также между циклами в течение 1–3 ($n = 15$), 1–4 ($n = 20$), 1–5 ($n = 25$) последовательностей.

Рассчитанные значения E для оценки точности должны находиться в пределах $\pm 20\%$ – для образцов на уровне LLOQ и $\pm 15\%$ – для остальных образцов КК. Для оценки прецизионности рассчитанное значение относительного стандартного отклонения (RSD, %) не должно превышать 20 % – для образцов на уровне LLOQ, 15 % – для остальных образцов КК.

Нижний предел количественного определения

На основании данных, полученных при оценке калибровочной кривой, точности и прецизионности, проводилась оценка параметра «нижний предел количественного определения». За НПКО методики принималась минимальная концентрация этмабена в плазме крови, которая поддается надежному количественному определению со значениями RSD и E не более 20 %.

Селективность

Для оценки способности методики дифференцировать этмабен и прометазин от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов, содержащихся в образце, были проанализированы по шесть холостых образцов, приготовленных на интактной плазме крови (ИПК), гиперлипидемической интактной плазме крови (ГЛИПК), гемолизной интактной плазме крови (ГИПК), а также образцы, соответствующие уровню LLOQ, также приготовленные на различных видах матрицы.

На холостых образцах, приготовленных на различных видах матрицы, сигнал этмабена не должен превышать 20 % от средних значений сигналов этмабена на уровнях LLOQ, сигнал ВС прометазина не должен превышать 5 % от средних значений сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ. Оценка данного параметра проводилась при полной валидации методики с аналитическим диапазоном № 1 (0,250–30,000 мкг/мл), а также при проведении частичной валидации с аналитическим диапазоном № 2 (0,040–35,000 мкг/мл) в связи с изменением НПКО методики.

Пригодность СО

Проводился анализ образца ИПК с добавлением ВС прометазина без добавления этмабена. Для данного образца сигнал этмабена не должен превышать 20 % от среднего значения сигналов, полученных при анализе образцов LLOQ, приготовленных на ИПК. Также был проведен анализ образца ИПК без добавления ВС прометазина с добавлением этмабена до концентрации, соответствующей калибровочному образцу № 9. Для данного образца сигнал ВС прометазина не должен превышать 5 % от среднего значения сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ.

Эффект матрицы

Для оценки данного параметра анализировали по шесть образцов на уровне L и H, приготовленных на различных видах матрицы (ИПК, ГЛИПК и ГИПК), без влияния биологической матрицы, а также по шесть образцов на уровне L и H, приготовленных на различных видах матрицы, без влияния степени извлечения. RSD фактора матрицы, нормализованного по ВС, не должно превышать 15 %.

Степень извлечения

Для оценки данного параметра проводили анализ образцов, приготовленных на ИПК, ГЛИПК и ГИПК без влияния степени извлечения и с учетом степени извлечения. Анализировали по три образца на уровнях L, M1, M2, M3, H, приготовленных на различных видах матрицы, без влияния степени извлечения, а также по три образца на уровнях L, M1, M2, M3, H, приготовленных на различных видах матрицы, с учетом влияния степени извлечения. Рассчитанное RSD степени извлечения этмабена из различных видов биологических матриц не должно превышать 15 %.

Перенос пробы

Для оценки переноса пробы были последовательно проанализированы калибровочные образцы № 9 и холостые образцы, приготовленные на ИПК. Также для оценки данного параметра были использованы данные, полученные при анализе образцов LLOQ, приготовленных на ИПК. Сигнал этмабена в холостых образцах не должен превышать 20 % от среднего значения сигналов на уровне LLOQ, сигнал ВС прометазина в образце не должен превышать 5 % от среднего значения сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ.

Стабильность

Была проведена оценка различных видов стабильности: краткосрочной стабильности («настойной» и «постпрепаративной»), стабильности при пятикратной заморозке-разморозке, стабильности стандартных растворов (исходных и рабочих), долгосрочной стабильности аналита в матрице. Оценка долгосрочной стабильности аналита в матрице проводилась методом бреккетинга дважды: была проведена промежуточная оценка в течение 112 дней, а также дополнительная оценка в течение 234 дней. Для оценки каждого вида стабильности были проанализированы по пять образцов на уровнях L и H. Полученные величины E не должны превышать ± 15 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждение

Ранее были опубликованы результаты доклинического исследования по изучению фармакокинетических параметров при пероральном введении этмабена грызунам и негрызунам. Аналитическая методика, используемая для количественного определения этмабена в плазме и моче крыс и кроликов, в данной работе описана не была [27]. Также имеются результаты исследования количественного определения этмабена в стандартном образце методом материального баланса. В ходе данного исследования проводился подбор условий для определения

родственных примесей этмабена с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) с использованием градиентного режима элюирования и хроматографической колонки Phenomenex Luna C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм [26]. Помимо этого, была разработана единая аналитическая методика для определения родственных примесей в СО, АФС и таблетках малобена и этмабена методом ВЭЖХ-УФ с использованием колонки Phenomenex Intersil® ODS-3V, 250 × 4,6 мм, 5 мкм [18].

Изучив литературные данные, мы можем сделать вывод, что до настоящего времени разработка и валидация биоаналитических методик определения этмабена в биологических образцах человека не проводилась и ни одной методики определения этмабена в плазме крови человека до настоящего момента опубликовано не было. Нами была проведена разработка первой методики количественного определения этмабена в плазме крови человека. Данная методика была валидирована и прошла успешную апробацию в аналитическом этапе I фазы КИ.

Разработка аналитической методики

Количественное определение этмабена проводилось с помощью наиболее селективного и чувствительного инструментального метода анализа – ВЭЖХ-МС/МС.

В качестве внутреннего стандарта было выбрано производное фенотиазина – прометазин ((RS)-N,N,α-триметил-10Н-фенотиазин-10-этанамин). Методика с данным ВС прошла валидацию, результаты оценки всех оцениваемых параметров соответствовали критериям приемлемости. На этом основании можно сделать вывод, что данное вещество полностью

удовлетворяет нашим требованиям и может использоваться в качестве ВС для количественного определения этмабена. На этапе разработки в качестве ВС рассматривалось схожее с этмабеном по химической формуле и физико-химическим свойствам производное малоновой кислоты – малобен (4,4'-(пропандиамида)дibenзоат натрия). Малобен не был выбран в качестве ВС, так как СО малобена содержал примеси этмабена в мешающем проведении анализа количества. Мы рассматриваем возможность улучшения данной биоаналитической методики путем использования малобена в качестве ВС при условии очистки СО малобена от примесей этмабена.

Разработка масс-спектрометрического детектирования начиналась с выбора источника и режима ионизации. Ионизация проводилась с помощью ESI. Молекула этмабена ионизировалась в отрицательном режиме. Был зарегистрирован ион-прекурсор этмабена с отношением массы к заряду 249,90 m/z. Далее был проведен анализ дочерних ионов, зарегистрированных при различных энергиях соударения (CE, collision energy). Были выбраны и оптимизированы 2 наиболее интенсивных MRM-перехода: 249,90 → 92,15 m/z (CE 35,6 кВ), 249,90 → 160,20 m/z (CE 9,2 кВ). Упрощенный масс-спектр этмабена с предполагаемыми путями фрагментации представлен на рисунке 4. Максимальная интенсивность была получена при установлении на игле ESI напряжения –5,0 кВ. Масс-спектрометрическое детектирование прометазина проводилось в положительном режиме ионизации. MRM-переход для прометазина: 284,95 → 197,95 m/z, напряжение на игле ESI +4,5 кВ, CE –26,6 кВ.

Были подобраны условия хроматографического разделения, позволяющие получить пики этмабена и прометазина с оптимальными хроматографически-

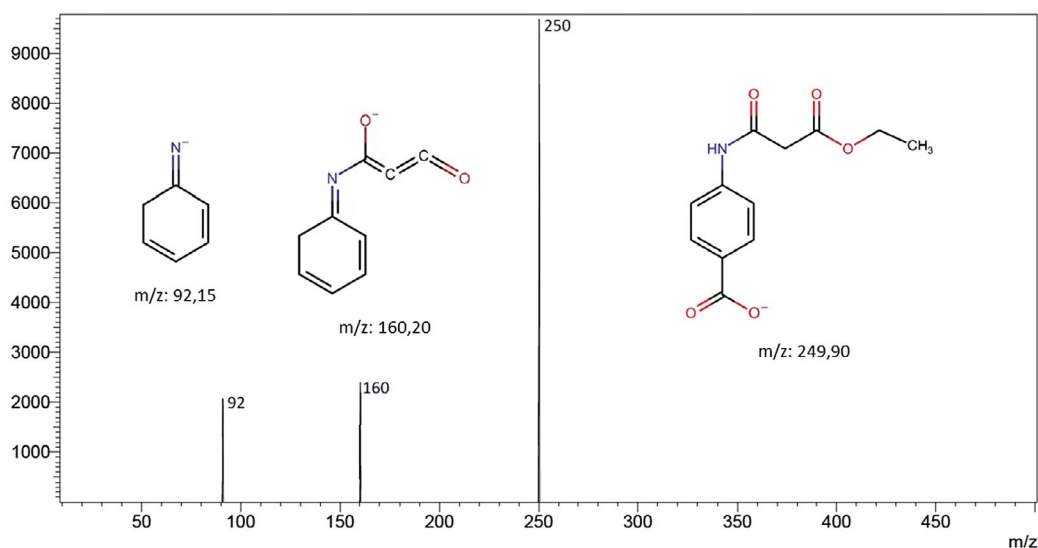


Рисунок 4. Спектр иона-прекурсора и дочерних ионов этмабена с предполагаемыми путями фрагментации

Figure 4. Product ion spectrum of parent ion and product ions of etmaben and its suggested fragmentation pathways

ми параметрами. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Luna C18, 100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм (Phenomenex, США). В качестве подвижной фазы были выбраны наиболее универсальные растворители: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А, по объему) и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В, по объему). Благодаря градиентному элюированию и скорости потока удалось добиться оптимальных хроматографических характеристик и сократить время анализа до 4 минут. Был выбран быстрый и простой способ пробоподготовки: осаждение белков плазмы крови ацетонитрилом в соотношении матрица:растворитель (1:2). Выбор данного способа пробоподготовки оправдывается отсутствием необходимости в дополнительном концентрировании пробы и повышении степени экстракции аналита.

В разработке биоаналитических методик для количественного определения инновационных препаратов особую сложность, в связи с отсутствием данных об оценке фармакокинетических параметров в плазме крови человека, представляет выбор аналитического диапазона методики. Аналитический диапазон данной методики был выбран с использованием оценочного подхода. Для этого была приготовлена серия растворов № 1 с концентрациями, приведенными в таблице 1. С использованием данных растворов были приготовлены модельные образцы с концентрациями, соответствующими оценочному диапазону 0,005–1,500 мкг/мл в плазме крови (см. таблицу 2). Были проанализированы пробы нескольких добровольцев, а также данные модельные образцы. На основании полученных данных была проведена корректировка аналитического диапазона. Для этого была приготовлена серия растворов № 2 (см. таблицу 1), из которой были приготовлены модельные образцы № 2, соответствующие аналитическому диапазону № 1 (см. таблицу 2). При проведении аналитического этапа исследования было обнаружено несоответствие полученных результатов ожидаемому диапазону концентраций, на основании которого был выбран аналитический диапазон методики. В связи с этим аналитический диапазон было необходимо скорректировать и провести частичную валидацию методики. Для этого была приготовлена серия растворов № 3 (см. таблицу 1), из которой были приготовлены модельные образцы № 3, соответствующие аналитическому диапазону № 2 (см. таблицу 2).

Результаты валидации аналитической методики

Калибровочная кривая

Для построения калибровочной кривой использовались значения, полученные при анализе калибровочных образцов № 1–9 (0,250–30,000 мкг/мл) при

проведении полной валидации методики и в валидационном цикле для оценки долгосрочной стабильности аналита в матрице (валидационные циклы № 1–3, 5), а также образцов № 1–10 (0,040–35,000 мкг/мл) при проведении частичной валидации (валидационный цикл № 4). Частичная валидация была проведена в связи с необходимостью валидировать измененный аналитический диапазон. Для оценки валидационного цикла № 5 использовался нерасширенный аналитический диапазон в связи с особенностями проведения оценки долгосрочной стабильности аналита в матрице.

На основе полученных значений были построены графики калибровочных кривых в координатах отношение площади пика этмабена к площади пика ВС прометазина от отношения концентрации этмабена к концентрации ВС прометазина. Калибровочные кривые описываются линейной функцией $f(x) = k \times x + b$. График калибровочной кривой валидационного цикла № 1 приведен на рисунке 5. Значения переменных и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах приведены в таблице 3.

Таблица 3. Значения переменных и коэффициенты корреляции

Table 3. Variable values and correlation coefficients

Цикл Cycle	k	b	R
1	0,0886	0,0055	0,9984
2	0,0692	0,0045	0,9977
3	0,0973	0,0041	0,9965
4	0,2377	0,0035	0,9972
5	0,4339	0,0260	0,9980

Точность и прецизионность

Рассчитанные значения E для оценки точности и RSD для оценки прецизионности соответствуют критериям приемлемости. Оценка точности и прецизионности на уровнях LLOQ, L, M1, M2, M3, H (0,250; 0,750; 1,500; 4,500; 18,000; 24,000 мкг/мл соответственно) проводилась в валидационных циклах № 1–3, 5; на уровнях LLOQ, L, M1, M2, M3, M4, H (0,040; 0,120; 0,175; 1,750; 5,250; 21,000; 28,000 мкг/мл соответственно) в валидационном цикле № 4. Данные о точности и прецизионности между валидационными циклами № 1–5 представлены в таблице 4.

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения этмабена в аналитическом диапазоне № 1 составил 0,250 мкг/мл, в аналитическом диапазоне № 2 после снижения НПКО методики – 0,040 мкг/мл. На рисунке 6 приведена хроматограмма образца плазмы крови, соответствующего уровню LLOQ с номинальной концентрацией в плазме крови 0,040 мкг/мл.

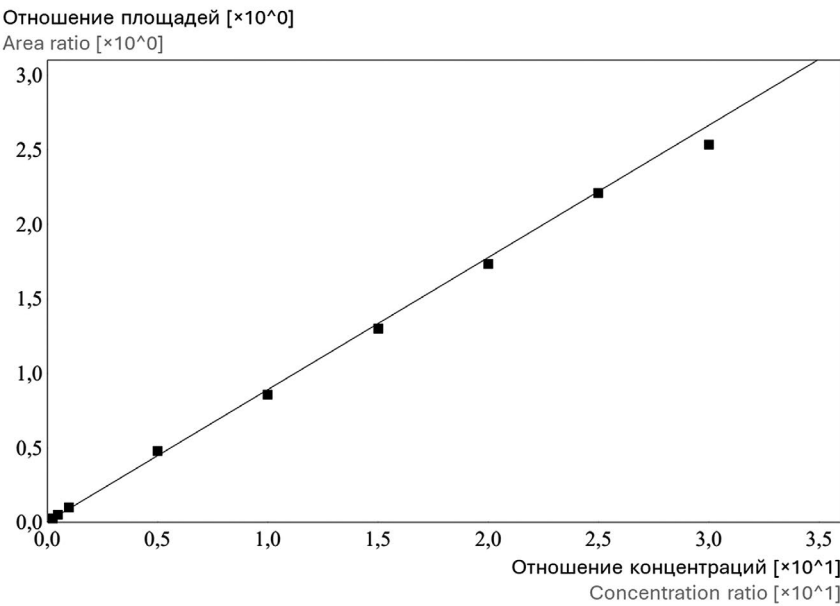


Рисунок 5. График калибровочной кривой
Figure 5. Calibration curve

Таблица 4. Точность и прецизионность между циклами № 1–5 ($n = 25$)
Table 4. Intra-day accuracy and precision in cycles № 1–5 ($n = 25$)

Уровень Level	LLOQ		L		M1		M2		M3		M4	H	
Введено (мкг/мл) Injected ($\mu\text{g/mL}$)	0,250	0,040	0,750	0,120	1,500	0,175	4,500	1,750	18,000	5,250	21,000	24,000	28,000
Среднее Average	0,256	0,040	0,772	0,120	1,545	0,166	4,778	1,660	17,742	4,982	18,631	23,243	25,456
RSD, %	8,49	10,42	7,29	7,26	4,84	7,96	4,29	6,60	8,21	4,74	3,51	8,38	6,49
E, %	2,22	−0,50	2,88	−0,17	2,99	−5,14	6,17	−5,17	−1,43	−5,10	−11,28	−3,15	−9,08

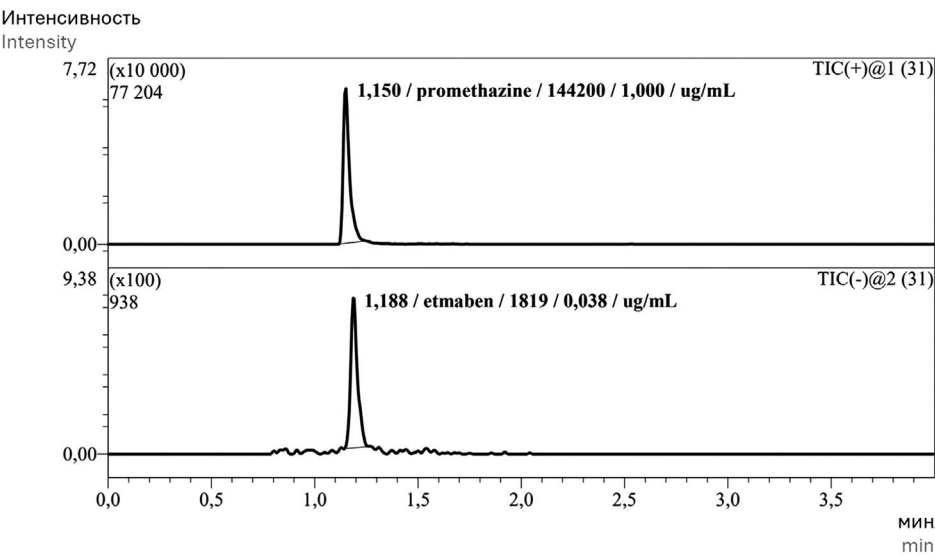


Рисунок 6. Хроматограмма образца плазмы крови на уровне НПКО
Figure 6. Chromatogram of LLOQ plasma sample

Селективность

Сигналы этмабена и ВС прометазина в холостых образцах, приготовленных на различных видах матрицы, не превышали 20 % от средних значений сигналов этмабена и 5 % от средних значений сигнала ВС, полученных при анализе образцов LLOQ, приготовленных на различных видах матрицы. На рисунке 7 представлена хроматограмма образца интактной плазмы крови человека. Несмотря на то, что на хроматограммах холостых образцов были детектированы пики аналита и ВС, их площади не превышали максимально допустимых значений и соответствовали указанным ранее критериям приемлемости.

Пригодность СО

Было доказано отсутствие влияния ВС прометазина и его примесей на этмабен: сигнал этмабена в образце ИПК с добавлением прометазина без добавления этмабена не превышал 20 % от среднего значения сигналов этмабена в образцах LLOQ; сигнал ВС прометазина на образце без добавления прометазина с добавлением этмабена не превышал 5 % от среднего значения сигналов ВС в образцах LLOQ, что соответствует критериям приемлемости.

Эффект матрицы

Был проведен анализ образцов L и H, приготовленных на ИПК, ГЛИПК и ГИПК без влияния степени извлечения и без влияния биологической матрицы, рассчитано значения фактора матрицы, нормализованного по ВС, и RSD. Фактор матрицы, нормализованный по ВС, рассчитывался как отношение площа-

ди пика этмабена на образцах L и H, приготовленных без влияния степени извлечения, к значению площади пика этмабена на образцах L и H, приготовленных без влияния биологической матрицы к площади пика прометазина на образце, приготовленном без влияния степени извлечения к значению площади пика прометазина на образце, приготовленного без влияния биологической матрицы. RSD не превышало 15 %, что соответствует критериям приемлемости (таблица 5).

Степень извлечения

Был проведен расчет степени извлечения и доказано эффективное и воспроизводимое извлечение этмабена из различных видов биологических матриц. Среднее значение степени извлечения из ИПК, ГИПК и ГЛИПК составило 90,26 %, RSD – 12,81 %, что соответствует критериям приемлемости (таблица 6).

Перенос пробы

В валидационных циклах № 1–3 был проведен последовательный анализ образцов с максимальной концентрацией (калибровочный образец № 9), а также холостых образцов ИПК. Сигнал этмабена в холостых образцах не превышал 20 % от среднего значения сигналов на уровне LLOQ, сигнал ВС прометазина в холостых образцах не превышал 5 % от среднего значения сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ, что соответствует критериям приемлемости. Результаты оценки приведены в таблице 7.

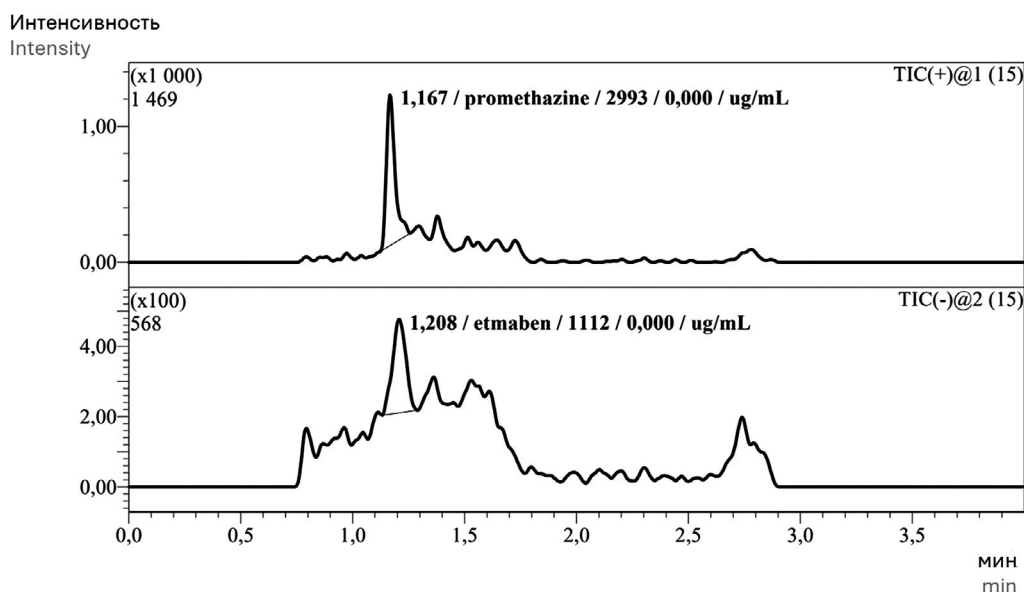


Рисунок 7. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 7. Chromatogram of blank human plasma sample

Таблица 5. Изучение эффекта матрицы

Table 5. Matrix effects assessment

Уровень Level	L			H		
Биологическая матрица Biological matrix	ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma	ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma
Нормализованный Mf Normalized Mf	0,76	0,79	0,80	0,88	0,95	1,00
	0,91	0,80	0,87	0,90	0,89	0,96
	1,06	1,03	1,03	0,95	0,93	0,97
	0,86	0,86	0,84	0,92	0,91	0,83
	0,80	0,94	0,87	0,89	0,91	0,91
Среднее Average	0,88			0,92		
RSD, %	10,29			4,63		

Таблица 6. Оценка степени извлечения этмабена

Table 6. Recovery assessment of etmaben

Биологическая матрица Biological matrix	ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma
Уровень Level	Среднее значение степени извлечения, % Average of recovery, %		
L	86,99	72,53	80,19
M1	98,13	91,21	87,28
M2	93,79	90,48	95,62
M3	88,31	110,82	98,34
H	85,52	89,63	85,07
Среднее Average	90,26		
RSD, %	12,81		

Стабильность

Была проведена оценка различных видов стабильности этмабена. Результаты оценки стабильности этмабена, а также сроки и условия хранения образцов для оценки представлены в таблице 8. Рассчитанные значения *E* соответствуют критериям приемлемости.

Таблица 7. Оценка переноса пробы

Table 7. Carry-over assessment

Цикл Cycle	1		2		3	
Название вещества Name	Этмабен Etmaben	Прометазин Promethazine	Этмабен Etmaben	Прометазин Promethazine	Этмабен Etmaben	Прометазин Promethazine
Значение площади, НПКО Area value, LLOQ	19313	676304	13973	607326	16730	557054
Значение площади, холостой образец Area value, blank	670	4605	0	5494	2854	5570
Отношение площадей, % Area ratio, %	3,47	0,68	0,00	0,90	17,06	1,00

Применение разработанной методики

Разработанная и валидированная методика количественного определения этмабена в плазме крови была успешно апробирована при проведении аналитической части I фазы КИ по изучению безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров различных доз препарата Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев. В данном КИ были изучены различные дозы и режимы дозирования препарата «Этмабен, 300 мг». При проведении аналитического этапа исследования было подтверждено, что разработанная нами методика пригодна для определения этмабена в плазме крови человека при проведении фармакокинетических исследований. Препарат не метаболизируется в плазме крови, поэтому ведется определение основного вещества, а не метаболита; никаких сопутствующих компонентов, мешающих детектированию этмабена, обнаружено не было. Пример хроматограммы добровольца, участвующего в данном исследовании, представлен на рисунке 8.

Таблица 8. Оценка стабильности этмабена
Table 8. Stability assessment of etmaben

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions		Среднее значение E, % Average value of E, %	
			L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализ свежеприготовленных образцов. Хранение при 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared. Stored at 20 ± 5 °C		-5,89	-14,72
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	Хранение в автосамплере хроматографа не менее 29 часов при 20 ± 5 °C Stored in a chromatograph autosampler for at least 29 hours at 20 ± 5 °C		11,01	-4,97
Стабильность при заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	5 циклов заморозки-разморозки: не менее 60 часов при -42,5 ± 7,5 °C (заморозка) и не менее 10 часов при 20 ± 5 °C (разморозка) 5 freeze-thaw cycles: at least 60 hours at -42.5 ± 7.5 °C (freeze) and at least 10 hours at 20 ± 5 °C (thaw)		1,68	-2,92
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	112 дней 112 days	при -20 ± 5 °C at -20 ± 5 °C	-1,36	-4,16
		при -75 ± 10 °C at -75 ± 10 °C	7,68	-5,71
	234 дней 234 days	при -20 ± 5 °C at -20 ± 5 °C	-1,36	-9,25
		при -75 ± 10 °C at -75 ± 10 °C	-6,05	-7,69
Стабильность исходных стандартных растворов Stock solution stability	112 дней при -42,5 ± 7,5 °C 112 days at -42.5 ± 7.5 °C		5,23	-7,33
Стабильность рабочих стандартных растворов Work solution stability			2,45	-7,27

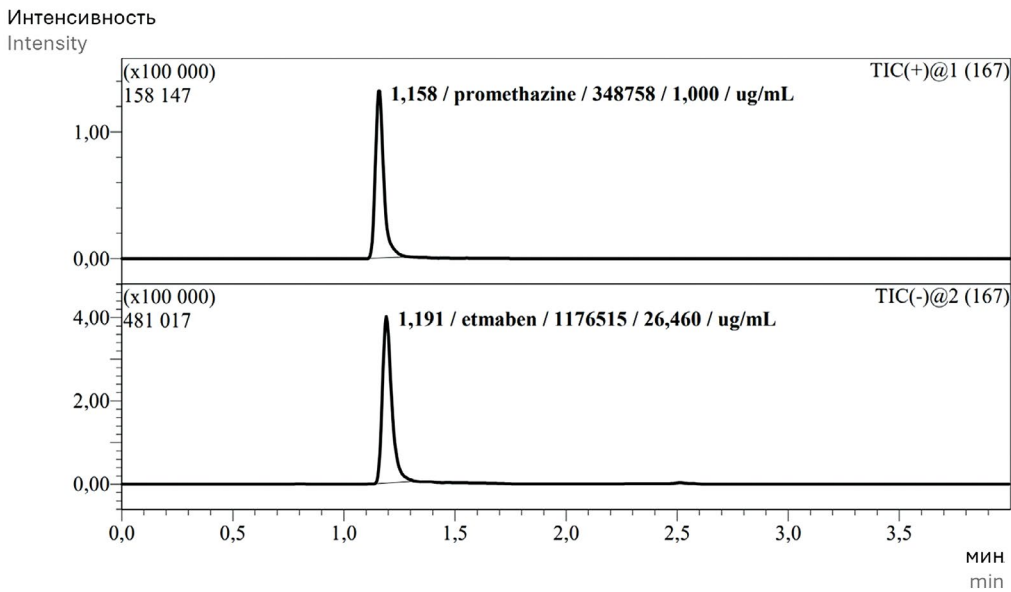


Рисунок 8. Хроматограмма образца плазмы крови добровольца
Figure 8. Chromatogram of volunteer plasma sample

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения инновационного препарата этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. До этого не производилась разработка и валидация биоаналитических методик определения этмабена в биологических образцах человека, поэтому данная методика количественного определения этмабена в плазме крови человека является первой. Подтвержденный аналитический диапазон валидированной методики составил 0,250–30,000 мкг/мл. Также в связи со снижением НПКО и повышением верхнего предела количественного определения методики была проведена частичная валидация. Новый подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,040–35,000 мкг/мл. Методика была успешно апробирована при проведении I фазы КИ этмабена на здоровых добровольцах и может применяться для других фармакокинетических исследований этмабена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Концевая А. В., Муканеева Д. К., Игнатъева В. И., Анциферова А. А., Драпкина О. М. Экономика профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации. *Российский кардиологический журнал*. 2023;28(9):5521. DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5521.
2. Campbell N. R., Ordunez P., Giraldo G., Morales Y. A., Lombardi C., Khan T., Padwal R., Tsuyuki R. T., Varghese C. WHO HEARTS: a global program to reduce cardiovascular disease burden: experience implementing in the Americas and opportunities in Canada. *Canadian Journal of Cardiology*. 2021;37(5):744–755. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.12.004.
3. Movsisyan N. K., Vinciguerra M., Medina-Inojosa J. R., Lopez-Jimenez F. Cardiovascular diseases in central and eastern Europe: a call for more surveillance and evidence-based health promotion. *Annals of global health*. 2020;86(1):21. DOI: 10.5334/aogh.2713.
4. Şahin B., İlgin G. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health & Social Care in the Community*. 2022;30(1):73–80. DOI: 10.1111/hsc.13156.
5. Nasarian E., Abdar M., Fahami M. A., Alizadehsani R., Hussain S., Basiri M. E., Zomorodi-Moghadam M., Zhou X., Plawiak P., Acharya U. R., Tan R. S. Association between work-related features and coronary artery disease: A heterogeneous hybrid feature selection integrated with balancing approach. *Pattern Recognition Letters*. 2020;133:33–40. DOI: 10.1016/j.patrec.2020.02.010.
6. Rehman S., Rehman E., Ikram M., Jianglin Z. Cardiovascular disease (CVD): assessment, prediction and policy implications. *BMC Public Health*. 2021;21(1):1–4. DOI: 10.1186/s12889-021-11450-z.
7. Timmis A., Townsend N., Gale C. P., Torbica A., Lettino M., Petersen S. E., Mossialos E. A., Maggioni A. P., Kazakiewicz D., May H. T., De Smedt D. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2019. *European heart journal*. 2020;41(1):12–85. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz859.
8. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., Bonny A. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982–3021. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
9. Крыжановский С. А., Лихошерстов А. М., Цорин И. Б., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Мокров Г. В., Гудашева Т. А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α, ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил) аминов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016;(2):10–13.
10. Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L. I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavalle C., Maestri V. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(21):8118. DOI: 10.3390/ijms21218118.
11. Сизова Ж. М. Фармакотерапевтические подходы к лечению стабильной стенокардии: трудные вопросы-простые решения. *Медицинский совет*. 2021;(4):34–40. DOI: 10.21518/2079-701X-2021-4-34-40.
12. Orellana-Urzuá S., Rojas I., Libano L., Rodrigo R. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress. *Current pharmaceutical design*. 2020;26(34):4246–4260. DOI: 10.2174/1381612826666200708133912.
13. Стаценко М. Е., Туркина С. В., Фабрицкая С. В., Полетаева Л. В. Миокардиальная цитопротекция при ишемической болезни сердца: что мы знаем об этом с позиции доказательной медицины? *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2011;(2):9–14.
14. Хабибулина М. М., Шамилов М. Д. Влияние метаболической терапии на состояние церебральной гемодинамики при гипеоэстрогемии. *Врач*. 2023;34(3):52–56. DOI: 10.29296/25877305-2023-03-10.
15. Ковансков В. Е., Кушнир В. И., Булатова С. А. Оценка влияния производных малоновой кислоты на выживаемость мышей в условиях гипоксии. Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 14 марта – 22 апреля 2022 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2022. С. 342–345.
16. Авенирова Е. Л., Алексеева П. А., Баранова Н. И., Басс М. С., Бурякина А. В., Питухина Н. Н., Федорова Е. В. Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства. *Биомедицина*. 2014;(1):4–10.
17. Юсковец В. Н., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойной кислоты. Патент России № 2515245 C1 от 07.02.2013.
18. Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Зеленцова А. Б. Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):209–216. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.
19. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Ивкина А. С., Бурякина А. В., Теслев А. А. Влияние производного бензойной кислоты на формирование экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Фармация*. 2016;63(4):49–52.
20. Вайнштейн В. А., Теслев А. А., Сорокин В. В., Яковлев И. П., Наркевич И. А., Бурякина А. В., Ивкин Д. Ю. Фармацевтическая композиция с антиишемической и антиоксидантной активностью и способ ее получения. Патент России № 2013153648/15 от 03.12.2013. Доступно по: <https://patentimages.storage.googleapis.com/08/87/3b/8e4964eac4f9fd/RU2545833C1.pdf>. Ссылка активна на 22.02.2024.
21. Вайнштейн В. А., Теслев А. А., Наркевич И. А., Яковлев И. П. Способ получения водорастворимого лиофилизата 4-(3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты, обладающей антиишемической и антиоксидантной активностью. Патент России № 2015124309/15 от 22.06.2015.
22. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Ковансков В. Е., Титович И. А. Экспериментальная оценка фармакологической безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2023;19(3E):95–98. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-95-98.
23. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2022;18(3):109–112. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.
24. Гришина А. Ю., Караваева А. В. Изучение алергизирующих свойств этмабена. От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов I Всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 52–54.

25. Гришина А. Ю., Евгеньева Е. М., Елецкая Е. И. Оценка мутагенного потенциала производного малоновой кислоты этмабена. От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов I Всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 55–57.
26. Адамова А. А. Количественное определение стандартного образца 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) методом материального баланса. Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 01–11 марта 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 163–166.
27. Гришина А. Ю., Карпов А. А. Изучение фармакокинетических параметров – 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена). От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов I Всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 58–61.
12. Orellana-Urzuá S., Rojas I., Libano L., Rodrigo R. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress. *Current pharmaceutical design*. 2020;26(34):4246–4260. DOI: 10.2174/1381612826666200708133912.
13. Statsenko M. E., Turkina S. V., Fabritskaya S. V., Poletaeva L. V. Myocardial cytoprotection in ischemic heart disease: what do we know about it from the point of evidence-based medicine? *Bulletin of Volgograd State Medical University*. 2011;(2):9–14. (In Russ.)
14. Habibulina M. M., Shamilov M. D. The influence of metabolic therapy on the state of cerebral hemodynamics in hypostrogenemia. *The Doctor*. 2023;34(3):52–56. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877305-2023-03-10.
15. Kovanskov V. E., Kushnir V. I., Bulatova S. A. Researching of the effect of malonic acid derivatives on the survival of mice in hypoxia. In Young pharmacy – the potential of the future: A collection of materials of the XII All-Russian Scientific Conference of students and postgraduates with international participation, St. Petersburg, March 14–18, 2022. Saint Petersburg: SPCPU; 2022. P. 342–345. (In Russ.)
16. Avenirova E. L., Alekseeva P. A., Baranova N. I., Bass M. S., Burjakina A. V., Pituhina N. N., Fedorova E. V. Molecular aspects of drug development: using methods of computer modeling to create new anti-ischemic agents. *Journal Biomed*. 2014(1):4–10. (In Russ.)
17. Yuskovets V. N., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing 4-((3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino)benzoic acid. Patent RUS No. 2515245 C1 dated 07.02.2013. (In Russ.)
18. Generalova Yu. E., Terninko I. I., Zelentsova A. B. End-to-end Standardization of Original Medicines when Determining Related Impurities. *Drug development & registration*. 2023;12(4):209–216. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.
19. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Dracheva A. V., Pituhina N. N., Ivkina A. S., Burjakina A. V., Teslev A. A. Effect of a benzoic acid derivative on the development of experimental chronic heart failure. *Pharmacy*. 2016;63(4):49–52. (In Russ.)
20. Vajnshtejn V. A., Teslev A. A., Sorokin V. V., Jakovlev I. P., Narkevich I. A., Burjakina A. V., Ivkin D. Yu. Pharmaceutical composition with anti-ischemic and antioxidant activity and method for preparing it. Patent RUS No. 2545833 C1 dated 03.12.2013. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/08/87/3b/8e4964eac4f9fd/RU2545833C1.pdf>. Accessed: 22.02.2024. (In Russ.)
21. Vajnshtejn V. A., Teslev A. A., Narkevich I. A., Jakovlev I. P. Method of producing water-soluble lyophilisate of 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoyl)amino)benzoic acid possessing anti-ischemic and antioxidant activity. Patent RUS No. 2602665 C1 dated 22.06.2015. (In Russ.)
22. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Kovanskov V. E., Titovich I. A. Experimental evaluation of the pharmacological safety of a new propandic acid derivative with a cardiotropic action. *Journal Biomed*. 2023;19(3E):95–98. (In Russ.) DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-95-98.
23. Ivkin D. Yu., Karpov A. A. Experimental evaluation of the effectiveness and safety of a new propandic acid derivative exhibiting cardiotropic action. *Journal Biomed*. 2022;18(3):109–112. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.
24. Grishina A. Y., Karavaeva A. V. Study of allergic effects of etmaben. In From molecule to drug: A collection of materials of the I All-Russian Scientific Conference. St. Petersburg, October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 52–54. (In Russ.)
25. Grishina A. Y., Evgenieva E. M., Eletskaia E. I. Evaluation of the mutagenic potential of malonic acid derivative etmaben. In From molecule to drug: A collection of materials of the I All-Russian Scientific Conference, St. Petersburg, October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 55–57. (In Russ.)
26. Adamova A. A. Quantitative determination of a reference standard of 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoyl)amino)benzoic acid (etmaben) by the material balance method. In Young pharmacy – the potential of the future: A collection of materials of the XIII All-Russian Scientific Conference of students and postgraduates with international participation, St. Petersburg, March 01 – 11, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 163–166. (In Russ.)
27. Grishina A. Y., Karpov A. A. Study of pharmacokinetic parameters of – 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoyl)amino)benzoic acid (etmaben). In From molecule to drug: A collection of materials of the I All-Russian Scientific Conference, St. Petersburg, October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 58–61. (In Russ.)

REFERENCES

1. Kontsevaya A. V., Mukaneeva D. K., Ignatieva V. I., Antsiferova A. A., Drapkina O. M. Economics of cardiovascular prevention in the Russian Federation. *Russian Journal of Cardiology*. 2023;28(9):5521. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5521.
2. Campbell N. R., Ordunez P., Giraldo G., Morales Y. A., Lombardi C., Khan T., Padwal R., Tsuyuki R. T., Varghese C. WHO HEARTS: a global program to reduce cardiovascular disease burden: experience implementing in the Americas and opportunities in Canada. *Canadian Journal of Cardiology*. 2021;37(5):744–755. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.12.004.
3. Movsisyan N. K., Vinciguerra M., Medina-Inojosa J. R., Lopez-Jimenez F. Cardiovascular diseases in central and eastern Europe: a call for more surveillance and evidence-based health promotion. *Annals of global health*. 2020;86(1):21. DOI: 10.5334/aogh.2713.
4. Şahin B., İlgin G. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health & Social Care in the Community*. 2022;30(1):73–80. DOI: 10.1111/hsc.13156.
5. Nasarian E., Abdar M., Fahami M. A., Alizadehsani R., Hussain S., Basiri M. E., Zomorodi-Moghadam M., Zhou X., Pławiak P., Acharya U. R., Tan R. S. Association between work-related features and coronary artery disease: A heterogeneous hybrid feature selection integrated with balancing approach. *Pattern Recognition Letters*. 2020;133:33–40. DOI: 10.1016/j.patrec.2020.02.010.
6. Rehman S., Rehman E., Ikram M., Jianglin Z. Cardiovascular disease (CVD): assessment, prediction and policy implications. *BMC Public Health*. 2021;21(1):1–4. DOI: 10.1186/s12889-021-11450-z.
7. Timmis A., Townsend N., Gale C. P., Torbica A., Lettino M., Petersen S. E., Mossialos E. A., Maggioni A. P., Kazakiewicz D., May H. T., De Smedt D. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2019. *European heart journal*. 2020;41(1):12–85. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz859.
8. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., Bonny A. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982–3021. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
9. Kryzhanovskii S. A., Likhoshervostov A. M., Tsorin I. B., Stolyaruk V. N., Vititnova M. B., Mokrov G. V., Gudasheva T. A. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α , ω -diarilmethyl derivatives of bis-(ω -aminoalkyl)amines. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;(2):10–13. (In Russ.)
10. Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L. I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavalle C., Maestri V. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(21):8118. DOI: 10.3390/ijms21218118.
11. Sizova Zh. M. Pharmacotherapeutic approaches targeting stable angina: simple solutions to complex problems. *Medical Council*. 2021;(4):34–40. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2021-4-34-40.