



Разработка, валидация и апробация биоаналитической методики определения этмабена в плазме крови и органах крыс методом ВЭЖХ-УФ

А. Б. Зеленцова✉, А. Ю. Гришина, Ю. Э. Генералова, Д. Ю. Ивкин, И. И. Тернинко

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, вн. тер. г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Зеленцова Анна Б. E-mail: anna.zelentsova@pharminnotech.com

ORCID: А. Б. Зеленцова – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>;
А. Ю. Гришина – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;
Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>;
Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;
И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 27.01.2026

Статья принята в печать: 11.03.2026

Статья опубликована: 22.05.2026

Резюме

Введение. Ввиду сохраняющейся тенденции роста количества пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями и уровня летальности в данной нозологической группе актуальным направлением R&D-исследований является поиск и фармацевтическая разработка инновационных кардиотропных препаратов. Одним из таких препаратов является производное малоновой кислоты – этмабен, синтезированный в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете (СПХФУ). Для проведения доклинических исследований необходимо наличие валидной биоаналитической методики, позволяющей с минимальными временными и ресурсными затратами количественно определять этмабен в сложных биологических матрицах.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения этмабена в плазме крови и органах лабораторных крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) с последующей апробацией и получением пула данных о распределении этмабена в органах и тканях экспериментальных животных.

Материалы и методы. Разработку и валидацию биоаналитической методики, а также определение количественного содержания этмабена проводили на жидкостном хроматографе Flexar (PerkinElmer, США), снабженном УФ-детектором и термостатируемым автодозатором, с использованием колонки Kromasil 100, 150 × 2,1, C8, 3,5 мкм (AkzoNobel, Нидерланды). Детектирование проводили при длине волны 270 нм. Фармакологический эксперимент для целей апробации методики проводили на 20 беспородных крысах-самцах (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово», Россия), разделенных на группу контроля (интактные животные, $n = 10$) и группу экспериментальной хронической сердечной недостаточности (ХСН) ($n = 10$), модель которой индуцировали перевязкой левой коронарной артерии. Все животные в течение 30 дней получали этмабен внутривенно в дозе 60 мг/кг. Для анализа на 30-е сутки у животных отбирали образцы цельной крови и изолировали органы (сердце, почки). В плазме крови и гомогенатах тканей проводили количественное определение этмабена методом ВЭЖХ-УФ после пробоподготовки, включающей осаждение белков ацетонитрилом (ос.ч., кат. № А/0626/17, Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и обсуждение. Разработаны оптимальные условия хроматографического определения этмабена в биологических матрицах (плазма крови и гомогенаты тканей) методом ВЭЖХ-УФ. Валидация разработанной методики проводилась по следующим валидационным параметрам: селективности, градуировочной кривой, правильности, прецизионности, нижнему пределу количественного определения (НПКО), эффекту переноса, отсутствию влияния разбавления образца, стабильности. Также оценивали степень извлечения этмабена из матрицы. НПКО этмабена составил 5,0 нг/мл. Разработанная методика была успешно применена для оценки распределения этмабена в органах и тканях лабораторных животных на отдельных этапах доклинического исследования. При ХСН концентрация этмабена в плазме крови возрастает в 2 раза, а в патологически измененном миокарде – на 47 % по сравнению с животными контрольной группы, при этом в тканях почки препарат не детектировался.

Заключение. Разработана и валидирована биоаналитическая методика определения этмабена методом ВЭЖХ-УФ, которая была апробирована на этапе доклинических испытаний препарата для изучения распределения в органах и тканях экспериментальных животных. Выявленное избирательное накопление этмабена в поврежденном миокарде подтверждает его терапевтическую релевантность для лечения ХСН.

Ключевые слова: биоаналитические исследования, производные малоновой кислоты, валидационные параметры, распределение в органах, доклинические испытания

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

Вклад авторов. А. Б. Зеленцова и Ю. Э. Генералова осуществляли выполнение эксперимента, обработку, интерпретацию данных и формулирование выводов, написание статьи. Моделирование патологии, введение этмабена, взятие проб крови и органов, пробоподготовка, написание статьи – А. Ю. Гришина. Д. Ю. Ивкин и И. И. Тернинко осуществляли планирование эксперимента, постановку задачи, анализ полученных данных, написание статьи, общее руководство проектом.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России». Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Зеленцова А. Б., Гришина А. Ю., Генералова Ю. Э., Ивкин Д. Ю., Тернинко И. И. Разработка, валидация и апробация биоаналитической методики определения этмабена в плазме крови и органах крыс методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2026;15(2):179–189. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2276>

Development, validation and testing of the HPLC-UV bioanalytical method for quantification of etmaben in blood plasma and organs of rats

Anna B. Zelentsova✉, Anna Yu. Grishina, Yulia. E. Generalova, Dmitrii Yu. Ivkin, Inna I. Terninko

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPCPU). 14A, Professora Popova str., Aptekarsky Ostrov Municipal Okrug, Saint Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna B. Zelentsova. **E-mail:** anna.zelentsova@pharminnotech.com

ORCID: Anna B. Zelentsova – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>;

Anna Yu. Grishina – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;

Yulia E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>;

Dmitrii Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 27.01.2026

Accepted: 11.03.2026

Published: 22.05.2026

Abstract

Introduction. Currently, the search and development of innovative cardiotropic drugs is an urgent task for pharmaceutical science. One such drug is a derivative of malonic acid, etmaben, which was synthesized at the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPCPU). To conduct preclinical and clinical studies, it is necessary to develop and validate a bioanalytical method that allows for the quantitative determination of etmaben in complex biological matrices with minimal time and resource requirements.

Aim. The aim of the study is to develop and validate a method for the determination of etmaben in the blood plasma and organs of laboratory animals using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) followed by testing and obtaining a pool of data on the distribution of etmaben in the organs and tissues of experimental animals.

Materials and methods. The development and validation of the bioanalytical method, as well as the quantitative determination of etmaben, were performed on a Flexar liquid chromatograph (PerkinElmer, USA) equipped with a UV detector and a thermostatted autosampler, using a Kromasil 100, 150 × 2.1, C8, 3.5 μm column (AkzoNobel, Netherlands). Detection was performed at a wavelength of 270 nm. A pharmacological experiment to test the method was conducted on 20 outbred male rats (Kurchatov Institute – "Rappolovo", Russia), divided into a control group (intact animals, $n = 10$) and a group with experimental chronic heart failure (CHF) ($n = 10$), a model of which was induced by ligation of the left coronary artery. All animals received etmaben intragastrically at a dose of 60 mg/kg for 30 days. Whole blood samples were collected for analysis on day 30, and organs (heart and kidneys) were isolated. Etmaaben was quantified in plasma and tissue homogenates using HPLC-UV after sample preparation, including protein precipitation with acetonitrile (HPLC Grade, cat. no. A/0627/17, Thermo Fisher Scientific, USA).

Results and discussion. Optimal conditions for the chromatographic determination of etmaben in biological matrices (blood plasma and tissue homogenates) using HPLC-UV were developed. The developed method was validated using the following validation parameters: selectivity, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification (LLOQ), carryover effect, no effect of sample dilution and stability. The degree of etmaben recovery from the matrix was also assessed. The LLOQ for etmaben was 5.0 ng/mL. The developed method was successfully applied to assess etmaben distribution in the organs and tissues of laboratory animals at specific stages of preclinical testing. In CHF, plasma concentrations of etmaben doubled, and in pathologically altered myocardium, they increased by 47 % compared to control animals.

Conclusion. A bioanalytical method for determining etmaben using HPLC-UV was developed and validated. It was tested during preclinical trials to study the drug's distribution in organs and tissues of experimental animals. The observed selective accumulation of etmaben in damaged myocardium confirms its therapeutic relevance for the treatment of CHF.

Keywords: bioanalytical studies, malonic acid derivatives, validation parameters, organ distribution, preclinical trials

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. Anna B. Zelentsova and Yulia E. Generalova performed the experiment, processing, interpretation of data and formulation of conclusions, writing the article. Pathology modeling, administration of etmaben, collection of blood and organ samples, sample preparation, writing the article – A. Yu. Grishina. Dmitrii Yu. Ivkin and Inna I. Terninko carried out the planning of the experiment, formulation of the task, analysis of the obtained data, writing the article, general management of the project.

Funding. The results were obtained using the equipment of the Shared Use Center «Analytical Center» of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University» of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Zelentsova A. B., Grishina A. Yu., Generalova Yu. E., Ivkin D. Yu., Terninko I. I. Development, validation and testing of the HPLC-UV bioanalytical method for quantification of etmaben in blood plasma and organs of rats. *Drug development & registration*. 2026;15(2):179–189. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2276>

ВВЕДЕНИЕ

Патологии сердечно-сосудистой системы занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости во всем мире и демонстрируют отчетливые тенденции к росту наряду с увеличением летальности, что определяет вектор поиска активных молекул с плеiotропным действием на миокард [1–3]. В ряду кардиотропных лекарственных средств отдельную нишу занимают препараты с антиишемическим и антиоксидантным эффектами, обладающие специфическим влиянием на метаболизм миокарда. В этой связи производные малоновой кислоты представляют целевой интерес в качестве структуральной основы для разработки препаратов, влияющих на миокард ввиду реализации способности к снижению интенсивности окислительных процессов за счет ингибирования функции митохондрий во всех звеньях дыхательной цепи. Это влияние на гликолиз и окислительное фосфорилирование лежит в основе механизма защиты сердечной мышцы от повреждения в ранние сроки острой ишемии миокарда [4].

Производное малоновой кислоты 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойная кислота (далее этмабен) – оригинальная активная фармацевтическая субстанция, разработанная в СПХФУ, является представителем нового класса соединений для терапии ишемической болезни сердца (ИБС) и хронической сердечной недостаточности (ХСН) [4, 5]. Внедрение препарата в клиническую практику требует детального изучения особенностей распределения в организме, в том числе в органах-мишенях, а также оценки влияния целевой патологии на его фармакокинетику.

Учитывая специфику исследуемых объектов (органы и биологические жидкости животных), при их анализе важно применять эффективные способы пробоподготовки и предварительного разделения компонентов пробы, нивелируя негативное влияние матрицы на ход анализа. Для биоаналитических исследований, подразумевающих обработку значительного количества проб (до нескольких сотен), следует отдавать предпочтение не только чувствительным, но и экспрессным методикам анализа, позволяющим получить большой пул данных за короткое время.

В настоящее время опубликовано несколько исследований по определению этмабена в биологических объектах с целью проведения фармакокинетических исследований [6–8].

Для определения данного вещества в плазме крови человека на этапе клинических испытаний был эффективно применен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [9, 10]. Несмотря на то, что метод ВЭЖХ-МС/МС имеет большую специфичность, он более ресурсозатратный, так как требует наличия дорогостоящего оборудования и соответствующей квалификации специалистов. Метод ВЭЖХ-УФ более универсален и доступен к реализации в большинстве лабораторий. В структуре молекулы этмабена присутствует несколько хромофорных групп (рисунок 1), что позволяет применять УФ-детектирование с достаточным уровнем чувствительности. Ранее нами была оценена возможность использования метода ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) для целей биоаналитических исследований [11]. Однако для

успешного применения аналитической методики необходимо проведение процедуры валидации с последовательной оценкой комплекса валидационных критериев, которые характеризуют ее достоверность и воспроизводимость [12–14].

Таким образом, **целью данного исследования** является разработка и валидация экспрессной и чувствительной биоаналитической методики количественного определения этмабена методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области с ее последующей апробацией и получением пула данных о распределении этмабена в органах и тканях экспериментальных животных в рамках доклинических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования является этмабен – производное *l*-аминобензойной кислоты (ПАБК) и малонового эфира (рисунок 1) в виде активной фармацевтической субстанции (АФС), синтезированное в СПХФУ [15].

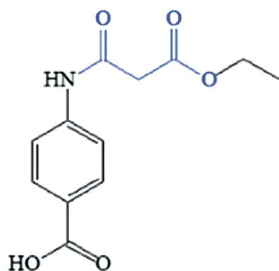


Рисунок 1. Структурная формула этмабена

Figure 1. Structural formula of etmaben

В качестве стандартного образца (СО) использовалась субстанция-порошок этмабена с количественным содержанием 99,6 %, аттестованная в качестве стандартного образца предприятия (СОП), серия 01/2023СОП, срок годности до 31.12.2025 [16].

Хроматографический анализ

Определение проводили на жидкостном хроматографе Flexar (PerkinElmer, США), снабженном УФ-детектором и термостатируемым автодозатором, с использованием колонки Kromasil 100, 150 × 2,1, C8, 3,5 мкм (AkzoNobel, Нидерланды), с предколонкой Kromasil 100, 4 × 2,1, 3,5 мкм (AkzoNobel, Нидерланды), колонку термостатировали при 40 °С. В качестве элюента использовали смесь 0,1%-го раствора муравьиной кислоты (х.ч., ООО «Компонент-Реактив», Россия) в воде и ацетонитрила (ос.ч., кат. № А/0626/17, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 70:30 (изократическое элюирование), скорость потока со-

ставляла 0,2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл, температура образцов – 4 °С, раствор для промывки иглы – смесь воды с ацетонитрилом 50/50. Детектирование проводили при длине волны 270 нм.

Изучение хроматографического поведения анализа проводили также с использованием хроматографической колонки C18 (Kromasil 100, 150 × 2,1, 3,5 мкм (AkzoNobel, Нидерланды), и смеси 0,03%-го (по массе) водного раствора трифторуксусной кислоты (ос.ч., кат. № 363317.1608, PanReac, Германия) и ацетонитрила (ос.ч., кат. № А/0626/17, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 70:30 (изократическое элюирование).

Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Chromera (PerkinElmer, США).

Валидация методики

Валидация биоаналитической методики была проведена в соответствии с регуляторными правилами исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза¹ по следующим параметрам: селективности, градуировочной кривой, правильности, прецизионности, нижнему пределу количественного определения (НПКО), эффекту переноса, отсутствию влияния разбавления образца, стабильности. Также оценивали степень извлечения этмабена из матрицы. Для статистической обработки использовались валидированные электронные таблицы, расчет результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel версии 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка аналитической методики

При разработке хроматографических условий опирались на данные литературы по физико-химическим характеристикам этмабена и ранее рекомендованным условиям [11, 17, 18], а именно: обращенно-фазовый сорбент, смесь раствора фосфорной кислоты и ацетонитрила в качестве подвижной фазы, условия детектирования. В качестве анализа использовали водный раствор этмабена ($P = 99,1\%$) с концентрацией 10 мкг/мл. Целью оптимизации рекомендованных условий было достижение максимальной чувствительности и сокращение времени хроматографирования. Так как чувствительность в хроматографических методах определяется соотношением сигнал/шум, то важно сформировать узкую хроматографическую зону, характеризующуюся мак-

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 19.10.2025.

симальной эффективностью. Для этого была использована узкая колонка (2,1 мм) с сорбентом с мелким зернением (3,5 мкм), выбор привитой фазы проведен между сорбентом C18 и C8 с аналогичной геометрией колонки в одинаковых условиях. На обеих колонках было проведено хроматографирование раствора этмабена с использованием 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в воде и 0,03%-го водного раствора трифторуксусной кислоты в качестве подвижной фазы. Исследование влияния объема вводимой пробы на эффективность формирования пика проводилось путем варьирования объема ввода (5, 10, 20 мкл). Также было установлено, что большое влияние на формирование хроматографической зоны оказывает растворитель пробы. Были приготовлены и проанализированы растворы этмабена в заданной концентрации, где растворителем выступали вода, ацетонитрил и их смесь в соотношении 1:1. Результаты исследования влияния переменных хроматографических условий на эффективность хроматографической системы представлены в таблице 1.

На колонке с октилсилильным сорбентом (C8) наблюдается большая эффективность, поэтому он был выбран для дальнейших исследований. При использовании в качестве водного компонента подвижной фазы растворов муравьиной и трифторуксусной кислот полученные результаты были идентичны друг другу по параметрам пика, следовательно, в испытаниях может быть использована любая из приведенных кислот. Фосфорная кислота не рекомендуется к использованию из-за возможности образования осадков в процессе анализа и загрязнения раствора подвижной фазы. Соотношение компонентов элюента (раствор кислоты и ацетонитрила) и скорость потока были выбраны таким образом, чтобы коэффициент емкости по пику этмабена имел значение около 2.

Несмотря на то, что больший объем пробы дает пик большей площади, наибольшая эффективность, а следовательно, чувствительность достигается при введении 5 мкл пробы. Такой эффект достигается в результате формирования более узкой хроматографической зоны и отсутствия «перегрузки» колонки по объему.

Очевидно, что увеличение доли ацетонитрила в растворителе пробы уменьшает эффективность пика, следовательно, в испытуемых образцах следует минимизировать его содержание. Согласно методике пробоподготовки доля ацетонитрила в образцах составляла около 60 %, поэтому для увеличения чувствительности и уменьшения размытия хроматографической зоны пробы следует разбавить в 2 раза водой. Более наглядно данный эффект наблюдается в диапазоне низких концентраций, где важно идентифицировать пик на фоне шума базовой линии.

Асимметрия пика этмабена в оптимизированных условиях сохраняется постоянной и находится в пределах 1,1–1,5.

Таким образом, были изучены и выбраны условия хроматографирования для этмабена, позволяющие проводить количественное определение с максимальной эффективностью и минимальными затратами времени. Методика была апробирована на интактной биологической матрице (плазма крови) и гомогенатах органов экспериментальных животных.

Результаты оценки валидационных характеристик

Селективность и НПКО

Селективность методики была оценена путем анализа 6 образцов интактной плазмы крови крыс (ИПКК), образцов интактной матрицы исследуемых органов (сердце, почка) и образцов ИПКК с введен-

Таблица 1. Влияние условий хроматографирования на эффективность хроматографической системы (n = 3)

Table 1. Effect of chromatographic conditions on the efficiency of a chromatographic system (average value for three determinations)

Параметр системы System parameter	Эффективность (число теоретических тарелок, N) Efficiency (number of theoretical plates, N)		
Тип сорбента Type of sorbent	C18 1085	C8 1347	
Состав водного (кислотного) компонента подвижной фазы The composition of the water (acid) component of the mobile phase	Муравьиная кислота Formic acid	Трифторуксусная кислота Trifluoroacetic acid	
	Параметры пика не изменяются The peak parameters do not change		
Объем пробы Sample volume	5 мкл 5 µl 3540	10 мкл 10 µl 1797	20 мкл 20 µl 675
Состав растворителя пробы The composition of the sample solvent	Вода Water 7627	Ацетонитрил Acetonitrile 943	Смесь воды и ацетонитрила 1:1 A mixture of water and acetonitrile 1:1 3135

ным точным количеством этмабена на уровне НПКО – 5 нг/мл. На хроматограммах интактной матрицы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим этмабену (сигнал пика, соответствующего этмабену по времени удерживания, в растворах матрицы не превышал 20 % от средних значений сигнала пика этмабена в растворах НПКО). Отношение сигнал/шум на хроматограмме ИПКК, содержащей этмабен, было равно 14 ± 2 .

На рисунке 2 представлено наложение хроматограмм ИПКК и ИПКК с добавлением этмабена на уровне НПКО (до 5 нг/мл).

Градуировочная кривая

Зависимость функции отклика от концентрации определяемого вещества оценивалась в диапазоне концентраций 5–200 нг/мл в трехкратной повторности. Рабочий диапазон концентраций рассчитывался на основании содержания этмабена в биологических матрицах экспериментальных животных, определенного ранее [10]. Градуировочная кривая представлена функцией зависимости площади пика от концентрации аналита в виде $y = ax + b$. Градуировочные растворы готовили путем добавления этмабена к интактной матрице в концентрациях 5; 10; 50; 100, 150 и 200 нг/мл. Средние значения концентраций калибровочных образцов были в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения для уровня концентраций выше НПКО и в пределах $\pm 20\%$ для уровня НПКО. Все три исследованные градуировочные зависимости были линейными в диапазоне исследуемых концентраций (рисунок 3). Значения коэффициентов уравнения линейной зависимости (a и b) и коэффициента корреляции (r) представлены в таблице 2.

Таблица 2. Значение переменных a и b и коэффициента корреляции

Table 2. The value of variables a and b and the correlation coefficient

Повторность Repetition	a	b	r
1	112,8	75,9	0,999
2	121,3	79,1	0,998
3	115,1	78,2	0,998

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности внутри цикла готовили по пять образцов для контроля качества, представляющих ИПКК с введенным точным количеством этмабена, соответствующим уровням концентраций 5 (НПКО), 15, 50, 100 и 200 нг/мл. Правильность методики рассчитывали по среднему значению отношения найденных концентраций к номинальному значению содержания этмабена. Прецизионность методики рассчитывали по величине относительного стандартного отклонения рассчитанных концентраций этмабена в приготовленных образцах. Значения правильности и прецизионности приведены в таблице 3.

Правильность и прецизионность между аналитическими циклами оценивали по результатам, полученным для трех аналитических циклов, проведенных в 2 разных дня. Максимальное относительное стандартное отклонение составило 9,4 %, правильность представлена диапазоном значений 94–108 %, что соответствует критериям приемлемости.

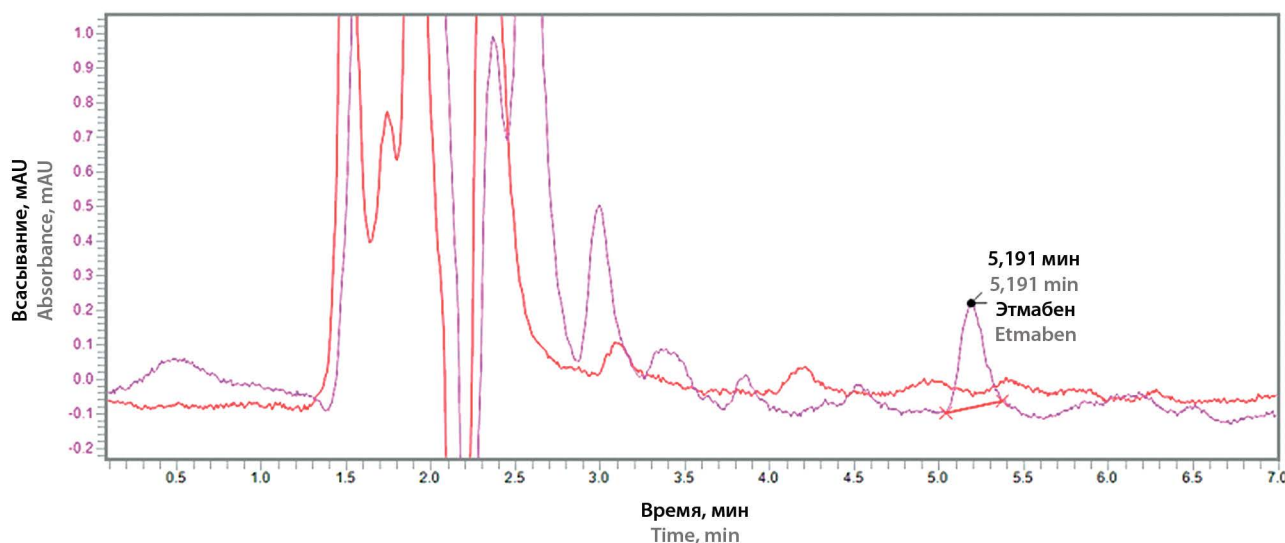


Рисунок 2. Наложение хроматограмм растворов интактной матрицы (красный) и НПКО (фиолетовый) (приблизительный вид хроматограммы)

Figure 2. Overlay of chromatograms of intact matrix (red) and low limit of quantification (violet) solutions (approximate view of the chromatogram)

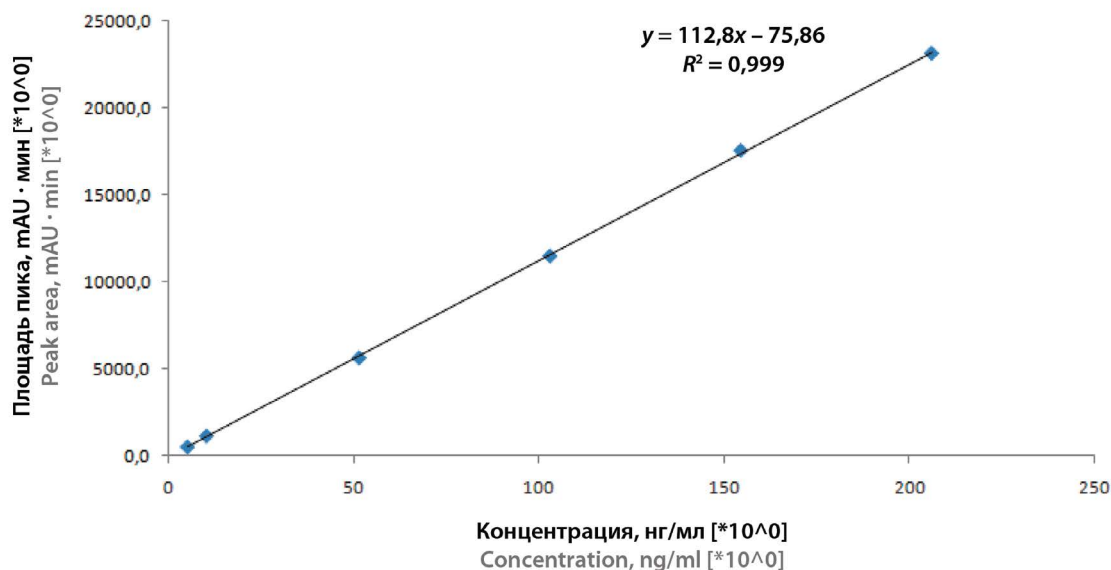


Рисунок 3. Градуировочная кривая

Figure 3. Calibration curve

Таблица 3. Результаты исследования правильности и прецизионности методики внутри цикла (n = 5)

Table 3. Results of the investigation of the accuracy and precision of the method within-run (n = 5)

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено, нг/мл Found, ng/ml	Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %	Правильность, % Accuracy, %
5	5,3	11,9	6,0
15	14,6	4,8	-3,0
50	51,0	4,1	2,0
100	98,0	3,1	-2,0
200	204,0	1,5	2,0

Влияние разбавления образца

Отсутствие влияния разбавления оценивали путем анализа пробы ИПКК с введенным точным количеством этмабена, соответствующим уровню концентрации 20 000 нг/мл. Пробу разводили в 10 раз раствором интактной матрицы и оценивали правильность и прецизионность определения концентрации этмабена на примере пяти модельных образцов. Правильность определения составила 99–102 %, относительное стандартное отклонение (n = 5) составило 2,1 %.

Эффект переноса

Перенос пробы определяли по отношению площади пика на хроматограмме холостого образца, анализируемого непосредственно после анализа об-

разца для контроля качества с уровнем содержания этмабена, равным верхнему пределу количественного определения. Среднее значение площади пика этмабена на хроматограмме холостого образца не превышало 3,4 % от площади пика образца для контроля качества с содержанием этмабена 200 нг/мл, что соответствует критериям приемлемости (не более 20 %).

Стабильность

Стабильность этмабена в образцах плазмы крови и растворах стандартного образца оценивали в анализируемых растворах при уровне НПКО (5 нг/мл) и высоком (200 нг/мл) уровне концентрации методом «введено – найдено». Стабильность стандартного раствора этмабена оценивали через 8 ч после приготовления (свежеприготовленный). Стабильность в ходе замораживания – размораживания оценивали после трехкратного замораживания при температуре $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ч и размораживания образцов для контроля качества. Кратковременную стабильность этмабена в испытуемых растворах оценивали в образцах для контроля качества после выдерживания в автодозаторе в течение 24 ч при температуре $20 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Исследования долговременной стабильности растворов проводили после хранения при температуре не выше $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 дней. Исследования, требующие хранения образца более 30 дней, не предусматриваются методикой. Образцы считались стабильными, если концентрация этмабена, измеренная после хранения, была в диапазоне от $\pm 15\%$ от номинальной концентрации. Результаты изучения стабильности представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты исследования стабильности

Table 4. Results of the investigation of stability

Условия хранения образцов Sample storage conditions	Отклонение от номинальной концентрации, % Deviation from the nominal concentration, %	
	5 нг/мл 5 ng/ml	200 нг/мл 200 ng/ml
Раствор стандартного образца через 8 ч от приготовления при хранении в условиях анализа Standard sample solution after 8 h from preparation when stored under analytical conditions	-1,0	0,0
Трехкратное замораживание – размораживание (-60 °С) в течение 12 ч Three freeze-thaw cycles (-60 °C) for 12 h	-4,0	-3,0
Выдерживание в автодозаторе в течение 24 ч при температуре 20 ± 5 °С Storage in autosampler for 24 h at 20 ± 5 °C	-2,0	-1,0
Хранение при температуре -60 °С в течение 30 дней Storage at -60 °C for 30 days	-6,0	-3,0

Степень извлечения

Степень извлечения этмабена определяли как отношение площади пика, полученного от добавленного и затем извлеченного из биологической матрицы количества вещества, к площади пика раствора сравнения, содержащего такое же количество вещества, добавленного к экстрагированному образцу матрицы.

Степень извлечения определяли при низком (5 нг/мл) и высоком (200 нг/мл) уровне концентрации этмабена. Среднее значение степени извлечения этмабена составило $92 \pm 12\%$ (RSD = 9,8 %).

Апробация биоаналитической методики

Для оценки работоспособности разработанная и валидированная методика ВЭЖХ-УФ была применена для сравнительного изучения накопления и распределения этмабена в органах-мишенях и системном кровотоке у интактных животных и животных с экспериментальной патологией.

В исследовании были использованы аутбредные крысы массой (450 ± 20) г (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово», Россия). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры выполняли в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) и биоэтическими нормами (протокол биоэтической комиссии Rats-РК-2023 от 26.10.2023). Животные были разделены на две группы:

1. **Группа контроля (n = 10):** животные с интактным, здоровым миокардом.
2. **Группа экспериментальной хронической сердечной недостаточности (ХСН, n = 10):** животные с моделью ХСН, индуцированной путем перевязки левой коронарной артерии.
Развитие и наличие ХСН подтверждали с помощью эхокардиографии.

Животные получали суспензию субстанции этмабена внутрижелудочно в дозе 60 мг/кг в течение 30 дней. На 30-е сутки эксперимента осуществляли забор проб цельной крови из десны в пробирки с гепарином лития. Плазму крови получали путем центрифугирования в течение 15 мин при 5000 об/мин и немедленно замораживали при -40 °С до проведения анализа.

Для оценки распределения препарата в органах-мишенях животных выводили из эксперимента, проводили изолирование сердца и почки. Органы промывали физиологическим раствором, высушивали фильтровальной бумагой и взвешивали.

Пробоподготовка биологического материала

Пробоподготовку проводили в соответствии со следующей схемой: образец ткани взвешивали и гомогенизировали с добавлением тройного объема физиологического раствора (0,9%-й водный раствор натрия хлорида (х.ч., АО «ВЕКТОН», Россия) до получения гомогенной взвеси. Полученную суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеточных компонентов. Супернатант в объеме 500 мкл переносили в пробирку, добавляли 2,5 мл ацетонитрила с последующей обработкой на вортексе «Таглер» ВМ-3 (ООО «НПП Таглер», Россия) и центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость декантировали в мерную колбу объемом 5 мл и доводили объем до метки 0,1 М раствором муравьиной кислоты.

На рисунке 4 представлены средние концентрации этмабена, определенные в плазме крови и гомогенатах тканей здоровых животных и животных с экспериментальной хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

Наибольшие концентрации этмабена были зафиксированы в плазме крови. Статистический анализ выявил достоверное увеличение системной концентрации препарата у животных с ХСН по сравнению с группой здоровых животных. Средняя концентрация этмабена в плазме крови в группе с ХСН ($2853,6 \pm 1253,4$ нг/мл) была практически в 2 раза выше ($p = 0,039$), чем в группе здоровых животных ($1516,1 \pm 602,5$ нг/мл). Выявленное повышение концентрации в плазме может быть следствием изменения объема распределения или снижения клиренса препарата на фоне патологии.

Анализ тканей миокарда выявил выраженное и статистически значимое увеличение концентрации этмабена в группе животных с ХСН. Средняя концент-

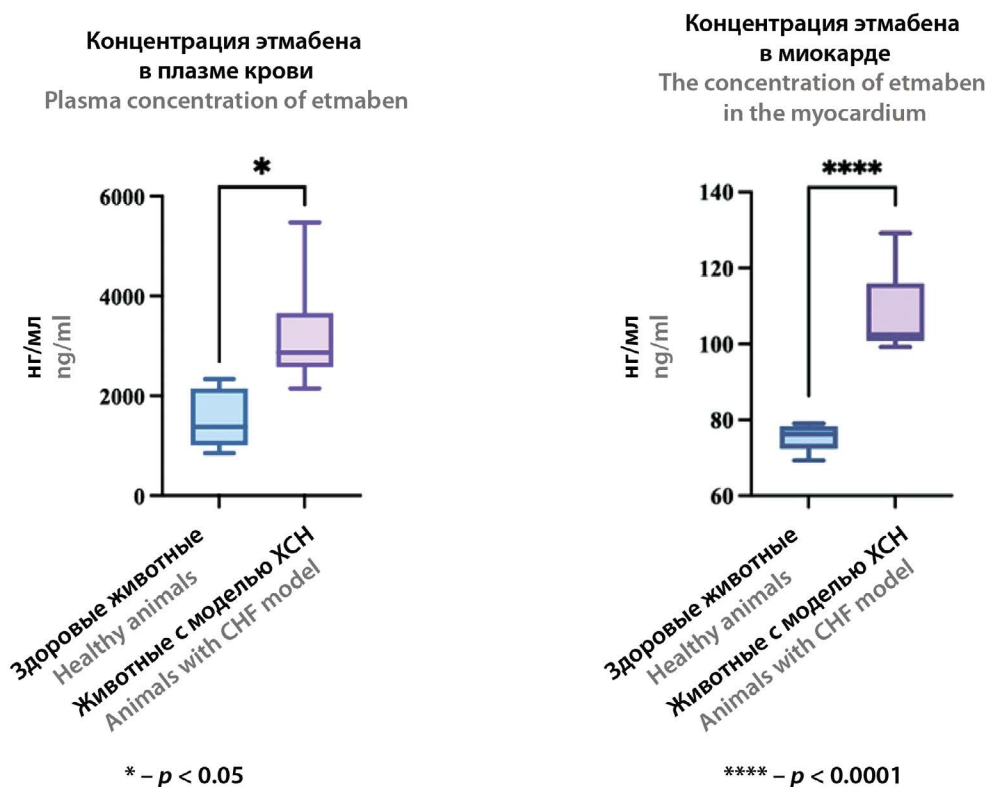


Рисунок 4. Содержание этмабена в плазме крови и миокарде

Figure 4. The concentration of etmaben in the blood plasma and myocardium

рация в миокарде животных с ХСН составила $109,6 \pm 10,2$ нг/мл, что на 47 % выше ($p < 0,001$), чем у здоровых животных ($74,6 \pm 3,8$) нг/мл. Данный результат демонстрирует, что патологическое состояние сердца приводит к значимо более интенсивному накоплению в нем исследуемого препарата.

Анализ содержания этмабена в почках показал, что во всех исследованных образцах его концентрация была ниже предела количественного определения. Отсутствие значимого накопления этмабена в почках в условиях ХСН указывает на контекстзависимый характер распределения препарата, который определяется типом патологического состояния.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при экспериментальной ХСН происходит значимое повышение концентрации этмабена в органе-мишени – миокарде. Выявленная способность препарата к избирательно более высокому накоплению в патологически измененном миокарде означает, что его кардиопротекторное действие может реализовываться в условиях, для коррекции которых он предназначен, – при ишемическом повреждении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоаналитическая методика количественного определения этмабена в плазме крови и органах лабораторных животных методом ВЭЖХ-УФ впервые

разработана и валидирована по следующим параметрам: селективности, градуировочной кривой, правильности, прецизионности, нижнему пределу количественного определения, эффекту переноса, отсутствию влияния разбавления образца, стабильности биообразцов в условиях хранения и пробоподготовки. Также оценивали степень извлечения этмабена из матрицы. Пул валидационных данных показал работоспособность методики и ее способность обеспечивать достоверные результаты, что обуславливает возможность ее применения для целей биоаналитики. С целью апробации методика была успешно применена для оценки степени накопления и распределения этмабена в органах животных (в том числе с целевой патологией) и системном кровотоке в доклинических испытаниях. В результате апробации методики установлено избирательное накопление этмабена в патологически измененном миокарде на фоне экспериментальной ХСН, что подтверждает его целевой кардиопротекторный потенциал.

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.

- Семенов В. Ю., Самородская И. В. Динамика мужской и женской смертности от болезней системы кровообращения в Российской Федерации (2013–2022гг.). *Российский кардиологический журнал*. 2025;30(5):6086. DOI: 10.15829/1560-4071-2025-6086.
- Галявич А. С., Терещенко С. Н., Ускач Т. М., Агеев Ф. Т., Аронов Д. М., Арутюнов Г. П., Беграмбекова Ю. Л., Беленков Ю. Н., Бойцов С. А., Бубнова М. Г., Васюк Ю. А., Виллевалде С. В., Виноградова Н. Г., Гарганеева А. А., Гендлин Г. Е., Гиляревский С. Р., Глезер М. Г., Готье С. В., Гринштейн Ю. И., Довженко Т. В., Драпкина О. М., Дупляков Д. В., Жиров И. В., Затейщиков Д. А., Звартау Н. Э., Иртыга О. Б., Кобалава Ж. Д., Козиолова Н. А., Коротеев А. В., Либис Р. А., Лопатин Ю. М., Мареев В. Ю., Мареев Ю. В., Мацкеплишвили С. Т., Михайлов Е. Н., Насонова С. Н., Нарусов О. Ю., Недогода С. В., Недошивин А. О., Овчинников А. Г., Орлова Я. А., Перепеч Н. Б., Погосова Н. В., Римская Е. М., Самко А. Н., Саидова М. А., Сапельников О. В., Сафиуллина А. А., Ситникова М. Ю., Скворцов А. А., Скибицкий В. В., Стукалова О. В., Тарловская Е. И., Терещенко А. С., Чесникова А. И., Федотов П. А., Фомин И. В., Хасанов Н. Р., Шевченко А. О., Шапошник И. И., Шария М. А., Шляхто Е. В., Явелев И. С., Якушин С. С. Хроническая сердечная недостаточность. Клинические рекомендации 2024. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(11):6162. DOI: 10.15829/1560-4071-2024-6162.
- 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.
- Abe J., Vujic A., Prag H. A., Murphy M. P., Krieg T. Malonate given at reperfusion prevents post-myocardial infarction heart failure by decreasing ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(4):691–697. DOI: 10.1007/s00395-024-01063-z.
- Gundogdu G., Senol O., Demirkaya Miloglu F., Koza Y., Gundogdu F., Naciüftüoğlu A., Abd El-Aty A. M. Serum metabolite profiling of ST-segment elevation myocardial infarction using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2020;34(2):e4738. DOI: 10.1002/bmc.4738.
- Ambati C. S. R., Yuan F., Abu-Elheiga L. A., Zhang Y., Shetty V. Identification and Quantitation of Malonic Acid Biomarkers of In-Born Error Metabolism by Targeted Metabolomics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2017;28(5):929–938. DOI: 10.1007/s13361-017-1631-1.
- Гришина А. Ю., Карпов А. А. Изучение фармакокинетических параметров – 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена). От молекулы до лекарственного препарата. В сб.: I Всероссийская научная конференция. 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 58–61.
- 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752.
- Карнакова П. К., Карнакова К. К., Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Попова М. О., Ивкин Д. Ю., Арчакова О. А., Шохин И. Е., Наркевич И. А. Изучение фармакокинетики производного малоновой кислоты этмабена в рамках I фазы клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):259–271. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965.
- Ивкин Д. Ю., Зеленцова А. Б., Краснова М. В., Карпов А. А., Пажельцев В. В., Напалкова С. М., Тернинко И. И., Титович И. А., Оковитый С. В. Сравнительная эффективность фармакотерапии хронической сердечной недостаточности в эксперименте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):349–357. DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998.
- Shang H., Dai X., Li M., Kai Y., Liu Z., Wang M., Li Q., Gu Y., Liu C., Si D. Absolute bioavailability, dose proportionality, and tissue distribution of rotundic acid in rats based on validated LC-QqQ-MS/MS method. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022;12(2):278–286. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.03.008.
- Putriana N. A., Rusdiana T., Puspitadewi N., Rahayu D., Saputri F. A. Validation of bioanalytical method for quantification of Vitamin K2 (МК-4) in human plasma by high-performance liquid chromatography-ultraviolet. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2023;14(4):345–350. DOI: 10.4103/JAPTR.JAPTR_139_23.
- Choi H.-I., Jeong H.-C., Jeong J.-W., Lee J., Kim D. H., Ko K.-C., Chae Y.-J., Lee K.-R. Development and validation of an LC-MS/MS method for Tirzepatide, a dual GIP/GLP-1 receptor agonist, in rat plasma for application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2026;1268:124836. DOI: 10.1016/j.jchromb.2025.124836.
- Юсковец В. Н., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойной кислоты. Патент РФ на изобретение № 2515245 С1 от 07.02.2013. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2515245C1/ru> Ссылка активна на 10.03.2026.
- Адамова А. А. Количественное определение стандартного образца 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) методом материального баланса. В сб.: XIII Всероссийская научная конференция школьников, студентов и аспирантов с международным участием. Молодая фармация – потенциал будущего. 01–11 марта 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 163–166.
- 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.
- Алексеева Г. М., Апраксин В. Ф., Генералова Ю. Э. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):66–71. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.

REFERENCES

- Kontsevaya A. V., Mukaneeva D. K., Ignatieva V. I., Antiferova 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.
- Semenov V. Yu., Samorodskaya I. V. Changes of male and female cardiovascular mortality in the Russian Federation over 2013–2022. *Russian Jour-*

- nal of Cardiology*. 2025;30(5):6086. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2025-6086.
3. Galyavich A. S., Tereshchenko S. N., Uskach T. M., Ageev F. T., Aronov D. M., Arutyunov G. P., Begrambekova Yu. L., Belenkov Yu. N., Boytsov S. A., Bubnova M. G., Vasyuk Yu. A., Villevalde S. V., Vinogradova N. G., Garganeeva A. A., Gendlin G. E., Gilyarevsky S. R., Glezer M. G., Gautier S. V., Grinstein Yu. I., Dovzhenko T. V., Drapkina O. M., Duplyakov D. V., Zhirov I. V., Zateishchikov D. A., Zvartau N. E., Irtyuga O. B., Kobalava Zh. D., Koziolova N. A., Koroteev A. V., Libis R. A., Lopatin Yu. M., Mareev V. Yu., Mareev Yu. V., Matskeplishvili S. T., Mikhailov E. N., Nasonova S. N., Narusov O. Yu., Nedogoda S. V., Nedoshivin A. O., Ovchinnikov A. G., Orlova Ya. A., Perepech N. B., Pogosova N. V., Rimsкая E. M., Samko A. N., Saidova M. A., Sapelnikov O. V., Safiullina A. A., Sitnikova M. Yu., Skvortsov A. A., Skibitskiy V. V., Stukalova O. V., Tarlovskaya E. I., Tereshchenko A. S., Chesnikova A. I., Fedotov P. A., Fomin I. V., Khasanov N. R., Shevchenko A. O., Shaposhnik I. I., Shariya M. A., Shlyakhto E. V., Yavelov I. S., Yakushin S. S. 2024 Clinical practice guidelines for Chronic heart failure. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(11):6162. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2024-6162.
 4. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Dracheva A. V., Pithubina N. N., Ivkina A. S., Buryakina 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.)
 5. Abe J., Vujic A., Prag H. A., Murphy M. P., Krieg T. Malonate given at reperfusion prevents post-myocardial infarction heart failure by decreasing ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(4):691–697. DOI: 10.1007/s00395-024-01063-z.
 6. Gundogdu G., Senol O., Demirkaya Miloglu F., Koza Y., Gundogdu F., Hacimüftüoğlu A., Abd El-Aty A. M. Serum metabolite profiling of ST-segment elevation myocardial infarction using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2020;34(2):e4738. DOI: 10.1002/bmc.4738.
 7. Ambati C. S. R., Yuan F., Abu-Elheiga L. A., Zhang Y., Shetty V. Identification and Quantitation of Malonic Acid Biomarkers of In-Born Error Metabolism by Targeted Metabolomics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2017;28(5):929–938. DOI: 10.1007/s13361-017-1631-1.
 8. Grishina A. Yu., Karpov A. A. Study of pharmacokinetic parameters of 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoyl)amino)benzoic acid (ethmaben). In From molecule to drug: In: I All-Russian Scientific Conference. October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 58–61. (In Russ.)
 9. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752.
 10. Karnakova P. K., Karnakova K. K., Komarov T. N., Bagaeva N. S., Popova M. O., Ivkin D. Yu., Archakova O. A., Shohin I. E., Narkevich I. A. Phase I pharmacokinetic study of etmaben, a malonic acid derivative. *Drug development & registration*. 2024;13(4):259–271. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965.
 11. Ivkin D. Yu., Zelentsova A. B., Krasnova M. V., Karpov A. A., Pazheltsev V. V., Napalkova S. M., Terninko I. I., Titovich I. A., Okovityi S. V. Comparative efficacy study of experimental chronic heart failure. *Drug development & registration*. 2025;14(1):349–357. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998.
 12. Shang H., Dai X., Li M., Kai Y., Liu Z., Wang M., Li Q., Gu Y., Liu C., Si D. Absolute bioavailability, dose proportionality, and tissue distribution of rotundic acid in rats based on validated LC-QqQ-MS/MS method. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022;12(2):278–286. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.03.008.
 13. Putriana N. A., Rusdiana T., Puspitadewi N., Rahayu D., Saputri F. A. Validation of bioanalytical method for quantification of Vitamin K2 (MK-4) in human plasma by high-performance liquid chromatography-ultraviolet. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2023;14(4):345–350. DOI: 10.4103/JAPTR.JAPTR_139_23.
 14. Choi H.-I., Jeong H.-C., Jeong J.-W., Lee J., Kim D. H., Ko K.-C., Chae Y.-J., Lee K.-R. Development and validation of an LC-MS/MS method for Tirzepatide, a dual GIP/GLP-1 receptor agonist, in rat plasma for application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2026;1268:124836. DOI: 10.1016/j.jchromb.2025.124836.
 15. Yuskovets V. N., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid. Patent RUS № 2515245 C1. 07.02.2013. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2515245C1/ru> Accessed: 10.03.2026. (In Russ.)
 16. 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: XIII All-Russian Scientific Conference of students and postgraduates with international participation. Young pharmacy – the potential of the future. March 01–11, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 163–166. (In Russ.)
 17. 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.
 18. Alekseeva G. M., Apraksin V. F., Generalova Yu. E. Exploring of acid-basic properties, development and validation of the method of quantitative determination of original pharmaceutical substance. *Drug development & registration*. 2019;8(1):66–71. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.