

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Карнакова Полина Константиновна

**Биоаналитические исследования инновационных препаратов – производных
малоновой кислоты**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Доктор фармацевтических наук,
Комаров Тимофей Николаевич

Санкт-Петербург, 2026 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Перспективы использования производных малоновой кислоты в фармакотерапии	14
1.2 Малобен как антистеатозное средство	17
1.3 Этмабен как средство для лечения ишемической болезни сердца	19
1.4 Методики определения малобена и этмабена	22
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1 Количественное определение малобена в биообразцах человека методом ВЭЖХ-МС/МС	30
2.1.1 Оборудование и программное обеспечение.....	30
2.1.2 Используемые реактивы, стандартные и биологические образцы.....	31
2.1.3 Используемые растворы.....	32
2.1.4 Приготовление растворов	33
2.1.4.1 Приготовление растворов подвижной фазы для ВЭЖХ-МС/МС.....	33
2.1.4.2 Приготовление стандартных растворов.....	34
2.1.5 Приготовление биологических образцов к анализу	37
2.1.6 Параметры ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения малобена.....	41
2.1.6.1 Хроматографические параметры.....	41
2.1.6.2 Масс-спектрометрические параметры.....	41
2.2 Валидация методики количественного определения малобена в плазме крови человека.....	42
2.3 Изучение фармакокинетики малобена	42
2.3.1 Клиническое исследования малобена.....	42

2.3.2 Статистический этап исследования малобена	44
2.3.3 Оборудование и программного обеспечение.....	45
2.4 Количественное определение этмабена в биообразцах человека методом ВЭЖХ-МС/МС	46
2.4.1 Оборудование и программное обеспечение.....	46
2.4.2 Используемые реактивы, стандартные и биологические образцы	47
2.4.3 Используемые растворы.....	48
2.4.4 Приготовление растворов	48
2.4.4.1 Приготовление растворов подвижной фазы для ВЭЖХ-МС/МС.....	48
2.4.4.2 Приготовление стандартных растворов для исследования этмабена..	49
2.4.5 Приготовление биологических образцов к анализу	52
2.4.6 Параметры ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения этмабена	56
2.4.6.1 Хроматографические параметры	56
2.4.6.2 Масс-спектрометрические параметры.....	56
2.5 Валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека.....	57
2.6 Изучение фармакокинетики этмабена.....	57
2.6.1 Клиническое исследования этмабена	57
2.6.2 Статистический этап исследования этмабена.....	59
2.6.3 Оборудование и программное обеспечение.....	61
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2	61
3.1 Разработка ВЭЖХ-МС/МС-методик количественного определения	63
3.2 Валидация биоаналитических методик.....	73
3.2.1 Валидация методики количественного определения малобена в плазме крови человека.....	73

3.2.1.1 Оценка селективности.....	73
3.2.1.2 Оценка пригодности стандартного образца	75
3.2.1.3 Оценка матричного эффекта.....	76
3.2.1.4 Оценка линейности и нижнего предела количественного определения	79
3.2.1.5 Оценка правильности и прецизионности	80
3.2.1.6 Оценка степени извлечения	82
3.2.1.7 Оценка переноса пробы.....	86
3.2.1.8 Оценка различных видов стабильности.....	87
3.2.2 Валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека.....	89
3.2.2.1 Оценка селективности	89
3.2.2.2 Оценка пригодности стандартного образца	92
3.2.2.3 Оценка матричного эффекта.....	93
3.2.2.4 Оценка линейности и нижнего предела количественного определения.....	97
3.2.2.5 Оценка правильности и прецизионности	99
3.2.2.6 Оценка степени извлечения	103
3.2.2.7 Оценка переноса пробы.....	106
3.2.2.8 Оценка различных видов стабильности.....	107
3.3 Практическое применение разработанной методики – исследование фармакокинетики малобена	109
3.3.1 Исследование фармакокинетики малобена при однократном дозировании.....	112
3.3.2 Исследование фармакокинетики малобена при многократном дозировании	117

3.3.3 Обсуждение полученных результатов	122
3.4 Практическое применение разработанной методики – исследование фармакокинетики этмабена.....	123
3.4.1 Исследование фармакокинетики этмабена при однократном дозировании	126
3.4.2 Исследование фармакокинетики этмабена при многократном дозировании	131
3.4.3 Обсуждение полученных результатов	136
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	140
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ	169

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Метаболически-ассоциированная жировая болезнь печени (МАЗБП) является одним из наиболее распространенных заболеваний печени, ассоциированных с метаболическим синдромом [1-3]. По данным международных эпидемиологических исследований, распространенность данного заболевания составляет около 25-35% и продолжает увеличиваться [4-8]. Применение препаратов с метаболическим, гиполипидемическим, антистеатозным действием, направленным на ключевые звенья патогенеза заболевания, является перспективным направлением в терапии МАЗБП [9-11].

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной смертности во всем мире, включая Россию: ежегодно фиксируется около 18 млн смертей, при этом данный показатель продолжает увеличиваться [12-16]. В структуре заболеваний сердечно-сосудистой системы доминирующее место занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС) [17-19]. Рост числа смертей от ИБС может быть обусловлен недостаточной эффективностью существующих схем лечения, а также нерациональной фармакологической коррекцией метаболических нарушений миокарда [16, 19]. Одним из перспективных направлений фармакотерапии ИБС является применение препаратов, направленных на оптимизацию энергетического обмена миокарда, снижение выраженности ишемических повреждений и коррекцию метаболических нарушений [20-23].

В качестве перспективных препаратов для лечения данных заболеваний рассматриваются производные малоновой кислоты (ПМК). В исследованиях по изучению активности ПМК была обнаружена выраженная фармакологическая активность малобена и этмабена [24-26]. Малобен продемонстрировал широкий спектр фармакологической активности (антистеатозная, антиоксидантная, антиапоптотическая, гиполипидемическая, гипохолестеринемическая, гипогликемизирующая и гликогеностатическая) и рассматривается как

потенциальное средство для терапии МАЖБП [9, 27-35]. Этмабен обладает антиишемической, антиоксидантной, антигипоксической и кардиопротективной активностью и может использоваться для лечения ССЗ, в частности ИБС [32, 36-44]. Лекарственные средства, содержащие малобен и этмабен, ранее не применялись у человека, их фармакокинетика у человека также не была изучена. В рамках проведения фармакокинетических исследований данных ПМК у человека есть необходимость в разработке биоаналитических методик, применимых для количественного определения малобена и этмабена в биологических образцах человека.

Степень разработанности темы исследования. В работах Адамовой А.А., Генераловой Ю.Э., Тернинко И.И. и др. представлены методики контроля качества, включая методики определения родственных примесей в стандартных образцах (СО), активной фармацевтической субстанции (АФС) и готовой лекарственной форме (ГЛФ) малобена и этмабена, однако для проведения биоаналитических исследований данные методики не применимы. В исследованиях по изучению фармакокинетики малобена и этмабена количественное определение данных веществ в биообразцах животных проводилось с помощью хроматографических методик. В работе Елецкой Е.И., Семивеличенко Е.Д., Сипкиной Н.Ю. приводится информация о методике определения малобена в биообразцах животных, также Сипкиной Н.Ю., Генераловой Ю.Э. и Яковлевым И.П. запатентован способ количественного определения малобена в биологических объектах, однако данные методики имеют ограниченное применение, в связи с регуляторными требованиями, распространяющимися на проведение исследований фармакокинетики у человека, а также особенностями проведения фазы I клинических исследований (КИ) препаратов с ранее не изученной фармакокинетикой. Информация о параметрах использованной методики определения этмабена в биообразцах животных, использованной в работе Гришиной А.Ю. и Карпова А.А., в доступных источниках не приводится.

В опубликованных рецензируемых источниках представлены многочисленные данные по изучению безопасности и эффективности малобена и

этмабена, полученные в рамках доклинических исследований (ДКИ) в работах Белых М.А., Гришиной А.Ю., Ежовой А.О., Елецкой Е.И., Ивкина Д.Ю., Карпова А.А., Семивеличенко Е.Д., Титович И.А. Также в ДКИ была изучена фармакокинетика малобена и этмабена у лабораторных животных. Препараты малобена и этмабена ранее не были изучены в рамках КИ, значения фармакокинетических параметров малобена и этмабена у человека не определены.

Цель диссертационной работы. Разработка и валидация биоаналитических методик количественного определения ПМК – малобена и этмабена – для оценки фармакокинетических параметров препаратов на основе малобена и этмабена в рамках фазы I КИ.

Задачи диссертационного исследования.

1. Разработать биоаналитическую методику количественного определения малобена в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) и провести ее валидацию в соответствии с действующими регуляторными требованиями.

2. Провести количественное определение малобена в образцах плазмы крови добровольцев, включенных в клиническое исследование фазы I лекарственного препарата, содержащего малобен, на основании изученных концентраций малобена в образцах плазмы крови добровольцев рассчитать фармакокинетические параметры малобена в рамках клинического исследования фазы I лекарственного препарата малобена.

3. Разработать биоаналитическую методику количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС и провести ее валидацию в соответствии с действующими регуляторными требованиями.

4. Провести количественное определение этмабена в образцах плазмы крови добровольцев, включенных в клиническое исследование фазы I лекарственного препарата, содержащего этмабен, на основании изученных концентраций этмабена в плазме крови добровольцев рассчитать

фармакокинетические параметры этмабена в рамках фазы I клинического исследования лекарственного препарата этмабена.

Научная новизна исследования. В исследовании впервые разработаны ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения малобена и этмабена в образцах плазмы крови человека для проведения биоаналитических исследований. Разработанные методики продемонстрировали свою пригодность для количественного определения малобена и этмабена в образцах плазмы крови человека в рамках проведения фармакокинетических исследований новых препаратов на основе ПМК. Впервые были определены концентрации малобена и этмабена в биообразцах добровольцев, а также оценены фармакокинетические параметры малобена и этмабена в рамках фазы I КИ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны подходы к проведению исследований ПМК, а именно подходы к разработке и валидации методик количественного определения малобена и этмабена в образцах плазмы крови человека с использованием современного метода инструментального анализа – ВЭЖХ-МС/МС. Представлен подход к выбору аналитических диапазонов биоаналитических методик при анализе инновационных веществ при отсутствии сведений об их фармакокинетике. Получены первые результаты оценки фармакокинетики ПМК малобена и этмабена у человека.

Подходы к проведению фармакокинетических исследований препаратов на основе малобена и этмабена использованы в научно-исследовательской деятельности ИЛ ЦККЛС ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Результаты исследований фармакокинетики препаратов малобена и этмабена у здоровых добровольцев использованы в научно-исследовательской деятельности Центра экспериментальной фармакологии СПХФУ Минздрава России (акт внедрения от 27.05.2026 г.).

Предложенные методологические основы и подходы к разработке, описанные в настоящей работе, внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра Общества с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (акт внедрения от 22.09.2025 г.).

Методики определения малобена и этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС внедрены в образовательный процесс на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии в рамках дисциплин «Фармацевтическая химия» и «Токсикологическая химия»; результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность кафедры фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии (акт внедрения от 02.04.2026 г.).

Методология и методы исследования. Методология исследования базировалась на комплексном биоаналитическом подходе, включающем разработку биоаналитических методик, их последующую валидацию, а также их применение при проведении биоаналитических исследований. В качестве основного инструментального метода был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрией, сочетающий высокую чувствительность и селективность.

Обработка экспериментальных результатов осуществлялась методами математической статистики (метод наименьших квадратов, расчет относительной погрешности и относительного стандартного отклонения). Расчет фармакокинетических параметров проводился с использованием методов описательной статистики, дополнительно проводилась оценка пропорциональности фармакокинетических параметров и дозы с использованием степенной модели.

Исследование проведено в соответствии с действующими на территории Российской Федерации регуляторными требованиями, регламентирующими проведение биоаналитических исследований (Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, утверждены решением №85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.).

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты разработки и валидации методики количественного определения малобена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.
2. Результаты разработки и валидации методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.
3. Результаты адаптации подхода к выбору аналитических диапазонов для методик количественного определения веществ с ранее неизученной у человека фармакокинетикой на примере малобена и этмабена.
4. Результаты исследования фармакокинетики малобена у добровольцев после однократного и многократного приема исследуемого препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в виде установленных фармакокинетических параметров и фармакокинетических профилей, а также результатов оценки дозовой пропорциональности основных фармакокинетических параметров.
5. Результаты исследования фармакокинетики этмабена у добровольцев после однократного и многократного приема исследуемого препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в виде установленных фармакокинетических параметров и фармакокинетических профилей, а также результатов оценки дозовой пропорциональности основных фармакокинетических параметров.

Степень достоверности и апробация работы. Основные результаты работы доложены и обсуждены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» в секции «Химия» в подсекции «Аналитическая химия» (Москва, 2024), на XIV Всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета «Молодая фармация – потенциал будущего» в секции «Стандартизация природных и синтетических лекарственных средств» (Санкт-Петербург, 2024), на конференции GLP-PLANET V в сессии «Фармацевтическая разработка и особенности ее аналитического сопровождения» (Санкт-Петербург, 2024), на конференции GLP-PLANET VI в сессии для студентов старших курсов и

аспирантов «Наука – дело молодых» (Санкт-Петербург, 2025), на международном конгрессе «Разработка и регистрация лекарственных средств» в секции «Клинические, доклинические и «околоклинические» исследования: современные тенденции и перспективы» (Москва, 2025), на международном конгрессе «Разработка и регистрация лекарственных средств» в секции «Регистрационные исследования лекарственных средств: от лаборатории до досье» (Москва, 2026), на I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая химия: практическая реализация прикладной науки» в рамках международной выставки и форума по фармацевтике и биотехнологиям IPhEB 2026 в секции «Биоаналитические исследования на этапах разработки и регистрации лекарственных средств» (Санкт-Петербург, 2026).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 статьи опубликованы в журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, рекомендованные ВАК Минобрнауки России, из которых 3 статьи опубликованы в изданиях, включенных в наукометрическую базу данных Scopus.

Связь задач исследования с планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в рамках тематики государственного задания «Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование по оценке эффективности и безопасности препарата Малобен, таблетки 60 мг у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени» (регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 125061106909-6, контракт № 056-03-2025-080/1 от 15 апреля 2025 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пункту 4: Разработка методов анализа

лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Лично автором была проведена разработка двух биоаналитических ВЭЖХ-МС/МС-методик (методики количественного определения малобена и методики количественного определения этмабена в плазме крови человека), их валидация, проведение анализа испытуемых образцов от здоровых добровольцев, а также проведение обработки полученных результатов. Вклад автора является основополагающим и составляет не менее 90%.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 172 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 31 рисунком и 39 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (2 главы) и заключения, списка литературы, включающего 145 источников (из них 64 источника – на иностранных языках), приложения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Перспективы использования производных малоновой кислоты в фармакотерапии

Малоновая кислота (МК) – пропандиовая кислота, относящаяся к двухосновным предельным карбоновым кислотам и участвующая в метаболических процессах в организме, а также в регуляции энергетического обмена [45-49]. Активированной формой МК является малонил-КоА, который образуется в организме под действием ацетил-КоА-карбоксилазы из ацетил-КоА [45, 49]. Малонил-КоА служит промежуточным звеном в биосинтезе жирных кислот (ЖК) и является субстратом для синтеза длинноцепочечных насыщенных ЖК [49-51]. Образование малонил-КоА происходит в митохондриях, пероксисомах и цитозоле клеток млекопитающих, а концентрация в цитозоле регулируется активностью ацетил-КоА-карбоксилазы и малонил-КоА-декарбоксилазы [45, 49, 52-54]. Помимо участия в липогенезе, малонил-КоА выполняет сигнальную функцию за счет аллостерического ингибирования карнитин-пальмитоил трансферазы I (фермента, регулирующего митохондриальное β -окисление ЖК). Благодаря этому малонил-КоА обеспечивает баланс между окислением глюкозы и ЖК [49-52, 55-60]. Трансформации малонил-КоА в цитозоле, пероксисомах и митохондриях представлены на рисунке 1 [61].

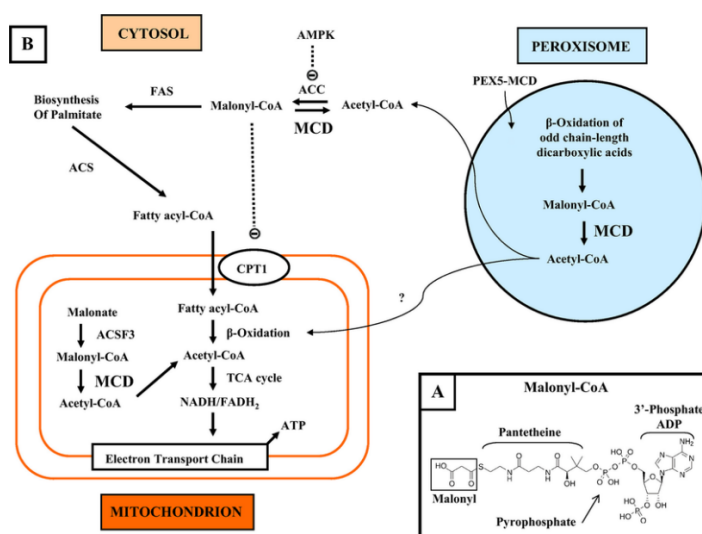


Рисунок 1 – Трансформации малонил-КоА в цитозоле, пероксисомах и митохондриях [61]

Нарушения в регуляции системы малонил-КоА влияют на развитие как сердечно-сосудистых, так и метаболических заболеваний. При ИБС из-за дисбаланса системы малонил-КоА происходит выраженное нарушение энергетического метаболизма миокарда, при этом активность ацетил-КоА-карбоксилазы снижается, что приводит к уменьшению образования малонил-КоА и ослаблению контроля над транспортом ЖК. Вследствие этого происходит избыточное окисление ЖК, нарушение баланса между окислением глюкозы и ЖК, а также развитие окислительного стресса, что также приводит к ряду последствий: увеличению потребления кислорода, развитию метаболического ацидоза и повреждению клеточных мембран. Таким образом, поддержание нормального уровня малонил-КоА способствует поддержанию оптимального баланса энергетического обмена в кардиомиоцитах и снижает риск развития ИБС [50, 51, 55, 62].

Аналогичные нарушения липидного обмена наблюдаются при МАЖБП: в гепатоцитах происходит повышение активности ацетил-КоА-карбоксилазы и чрезмерное образование малонил-КоА, приводящее к активации липогенеза и торможению митохондриального β -окисления ЖК. Это создает условия для накопления триглицеридов в клетках, приводит к стеатозу и ожирению, что в сочетании с продукцией фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) является причиной инсулинорезистентности [63]. Данные изменения способствуют прогрессированию заболевания до фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы при сахарном диабете 2 типа (СД-2) [64-66]. Также известно, что МАЖБП повышает риск развития заболеваний сердечно-сосудистой системы [67, 68].

Малонат также является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы и снижает интенсивность окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной функции митохондрий во всех звеньях дыхательной цепи [24, 49]. Известно, что МК за счет сходства с сукцинатом может препятствовать избыточному сукцинированию регуляторных белков при широком спектре метаболических заболеваний, в том числе при ожирении,

метаболическом синдроме, сахарном диабете и жировой болезни печени. МК за счет конкурентного ингибирования сукцинатдегидрогеназы нормализует ее активность и за счет этого уменьшает избыточное образование активных форм кислорода и стабилизирует метаболические процессы [69].

Среди ПМК достаточно изучен ингибитор сукцинатдегидрогеназы диметилмалонат. Диметилмалонат рассматривается как потенциальное средство для лечения воспалительных заболеваний печени, связанных с чрезмерной активацией сукцинат зависимых путей за счет снижения накопления сукцината и продукции митохондриальных активных форм кислорода [70]. Диметилмалонат продемонстрировал нейропротекторные свойства: отмечено уменьшение объема церебрального инфаркта, увеличение числа нейронов и улучшение когнитивных и двигательных функций у новорожденных мышей [71]. Некоторые ПМК обладают антиоксидантным действием за счет влияния на антиоксидантные ферменты (каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, супероксиддисмутазу), что может использоваться для коррекции оксидативного стресса при заболеваниях печени [72]. Также известно другое фармакологически активное ПМК – малотилат. Обнаружено, что малотилат ускоряет нормализацию нарушенного белкового обмена и пролиферацию клеток печени, способствуя ее регенерации, что позволяет рассматривать его как потенциальное средство для лечения заболеваний печени [73, 74].

Ингибирование сукцинатдегидрогеназы ПМК рассматривается как перспективный терапевтический подход к лечению сердечной недостаточности. При ишемии в кардиомиоцитах из-за нарушения работы дыхательной цепи происходит метаболический сдвиг и накопление митохондриального сукцината. Его быстрое окисление приводит к избыточному образованию активных форм кислорода, вызывающих повреждение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и снижение регенерации кардиомиоцитов. Ингибирование сукцинатдегидрогеназы снижает образование митохондриальных активных форм кислорода, способствует пролиферации кардиомиоцитов и реваскуляризации, а также снижает выраженность ишемически-реперфузионного повреждения сердца [75-78].

Таким образом, производные малоновой кислоты представляют особый интерес как средства коррекции липидного и энергетического обмена. При проведении исследований фармакологической активности ПМК было установлено, что малобен и этмабен проявляют выраженную активность, что делает их перспективными кандидатами для создания новых лекарственных препаратов [24-26].

1.2 Малобен как антистеатозное средство

Метаболически-ассоциированная жировая болезнь печени тесно связана с метаболическим синдромом (МС) и относится к одному из наиболее распространенных заболеваний печени [1-3]. По данным международных эпидемиологических исследований, распространенность данного заболевания составляет около 25-35% и продолжает увеличиваться, что также коррелирует с увеличением распространенности СД-2 и ожирения [4-8].

МАЗБП объединяет ряд патологических состояний: от жирового стеатоза до неалкогольного стеатогепатита (с риском прогрессирования до фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы) [64-66]. Патогенез МАЗБП отличается системным характером и двунаправленной связью с основными компонентами МС (ожирением, артериальной гипертензией, нарушением углеводного и липидного обмена), создавая замкнутый круг, где одно нарушение инициирует и усиливает другое [79, 80]. Наиболее высокая распространенность МАЗБП наблюдается среди пациентов, страдающих СД-2 и ожирением [81, 82]. Отмечается, что наличие в анамнезе СД-2 увеличивает риск прогрессирования МАЗБП до более тяжелых форм [83]. Также МАЗБП повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) – ведущей причины смертности среди пациентов с диагнозом МАЗБП [6, 67, 68, 83].

Для эффективной фармакотерапии МАЗБП необходимо действовать комплексно и устранять ключевые звенья патогенеза: нормализовать метаболические нарушения, снизить массу тела, сократить выраженность стеатоза и воспалительных заболеваний печени с целью предотвращения риска

прогрессирования данного заболевания [9-11]. Перспективным направлением терапии МАЖБП является применение препаратов с метаболическим, гиполипидемическим и антистеатозным действием [11]. Их использование направлено на коррекцию липидного профиля, устранение последствий ожирения, снижение рисков ССЗ и СД-2, а также предотвращение дальнейшего прогрессирования МАЖБП [9].

Малобен (4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия) известен с конца прошлого века: в 1990-х годах были получены авторские свидетельства на «Вещество с антиоксидантной активностью» (Бородин Е. А., Доровских В. А., Зражевская Е. В.) [84] и «Средство, обладающее антиалкогольным действием» (Доровских В. А., Левченко Н. Р., Тарасенко С. Н.) [85]. Впервые экспериментально был зафиксирован коронадилататорный эффект, противоинфарктное и антисклеротическое действия данного соединения [84, 85]. В 2019 году был зарегистрирован патент на антистеатозное средство на основе малобена [27], а также способ получения малобена путем взаимодействия п-аминобензойной кислоты с малоновым эфиром [86]. Структурная формула малобена представлена на рисунке 2.

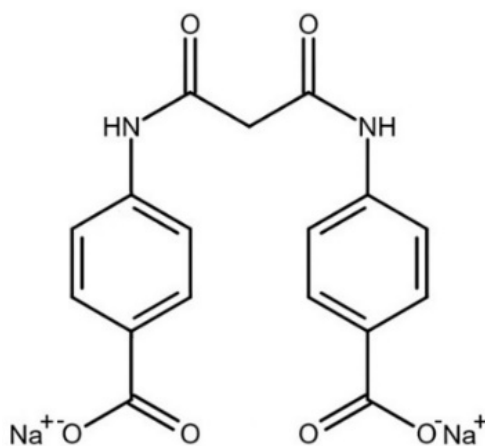


Рисунок 2 – Структурная формула малобена

На базе Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ) был проведен комплекс доклинических исследований малобена [9, 26-35, 87-92]. Была изучена безопасность и эффективность АФС малобена и ГЛФ (таблетки) малобена [27, 30].

Для АФС малобена были установлены низкая острая токсичность («5 класс токсичности или не классифицируется», доза 2000 мг/кг не вызвала летального исхода) и отсутствие алергизирующего и иммунотоксического действия (без влияния на гуморальное и клеточное звенья иммунитета) [27, 30]. Для ГЛФ было подтверждено отсутствие острой и хронической токсичности, местнораздражающего действия (при внутрижелудочном введении), отсутствие мутагенности и цитогенетической активности, отсутствие эмбрио-, фето- и репродуктивной токсичности [27, 30, 88]. Также на лабораторных животных (кроликах-самцах породы советская шиншилла и аутбредных крысах-самцах) было установлено, что фармакокинетика малобена имеет линейную зависимость и дозозависимый характер, кумуляция не была выявлена [30, 87].

В исследованиях по изучению специфической фармакологической активности малобена был установлен широкий спектр биологической активности данного соединения, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного препарата для лечения МАЖБП, в первую очередь за счет своей антистеатозной активности [9, 27-33]. Также малобен имеет высокую неферментативную антиоксидантную активность, обладает антиапоптотическим действием, оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность гепатоцитов, что позволяет использовать малобен для коррекции метаболических нарушений и лечения стеатоза печени [9, 28, 30, 32, 34, 85]. К прочим эффектам малобена относится гиполипидемическое, гипохолестеринемическое, гипогликемизирующее и гликогеностатическое действие, а также торможение развития липидоза и атеросклероза аорты (благодаря стимулированию липолитической активности эндотелия сосудов) [9, 27-35].

Результаты доклинических исследований малобена стали основанием для проведения I фазы КИ препарата малобена у здоровых добровольцев [93].

1.3 Этмабен как средство для лечения ишемической болезни сердца

Во всем мире, включая Россию, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной смертности: ежегодно фиксируется около 18 млн

смертей, при этом данный показатель продолжает увеличиваться и к 2030 году прогнозируется рост вплоть до 22,3 млн [12-16]. В структуре заболеваний сердечно-сосудистой системы доминирующее место занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС), возникающая вследствие гипоксии кардиомиоцитов (из-за несоответствия между потребностью миокарда в кислороде и его фактическим обеспечением), что приводит к окислительному стрессу, повреждению кардиомиоцитов и их гибели [17-19, 94-96]. Рост числа смертей от ИБС может быть обусловлен недостаточной эффективностью существующих схем лечения, а также нерациональной фармакологической коррекцией метаболических нарушений миокарда [16, 19].

Современные подходы к лечению ИБС включают использование препаратов, воздействующих на метаболические процессы в кардиомиоцитах, снижающих последствия окислительного стресса, а также оптимизирующих энергообеспечение миокарда (за счет усиления аэробного гликолиза и снижения интенсивности окисления ЖК). В связи с этим значительных интерес представляют препараты комбинированного действия, сочетающие антиангинальные, антиоксидантные и антигипоксанта́ные эффекты и обеспечивающие функции кардиомиоцитов в условиях гипоксии [20-23].

В рамках поиска новых препаратов с антиишемической активностью значительный интерес представляют производные малоновой кислоты, в частности, этмабен (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота). Структурная формула малобена представлена на рисунке 3. Данное соединение разработано в СПХФУ при непосредственном участии профессора Денисенко П.П. [97, 98].

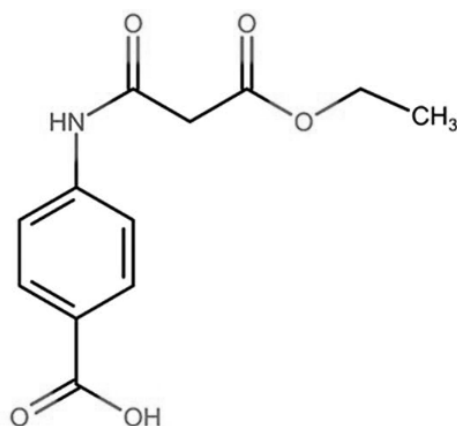


Рисунок 3 – Структурная формула этмабена

Запатентованы схемы синтеза этмабена [98, 99], фармацевтическая композиция и технология получения готовых лекарственных средств на основе этмабена [100, 101], также опубликованы результаты доклинических исследований этмабена [21, 36-44, 102-109]. В исследованиях с помощью метода молекулярного докинга были предсказаны антиишемические и кардиопротективные эффекты этмабена [24, 32]. По результатам доклинических исследований подтверждена безопасность фармацевтической субстанции этмабена и таблеток на ее основе; оценена фармакологическая безопасность фармацевтической субстанции этмабена и изучена фармакокинетика и фармакодинамика этмабена у лабораторных животных [39-41, 103, 105, 107]. На лабораторных животных установлено, что этмабен обладает выраженным антиоксидантным, антиишемическим, антигипоксическим и кардиопротективным действием, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного средства для терапии ИБС и хронической сердечной недостаточности [32, 36-44]. Эффекты этмабена реализуются за счет воздействия на процессы гликолиза и окислительного фосфорилирования, снижения окислительного стресса и интенсивности протекающих окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной функции митохондрий на различных участках дыхательной цепи [21, 32, 42]. Значимую роль в механизме действия этмабена играет его антирадикальная активность, воздействие на активность ключевых ферментов защиты клеток от

окислительного стресса (каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу), а также на активацию аденозинового рецептора типа A3 [32].

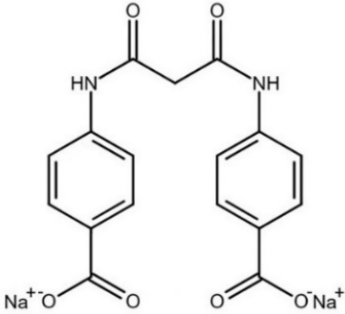
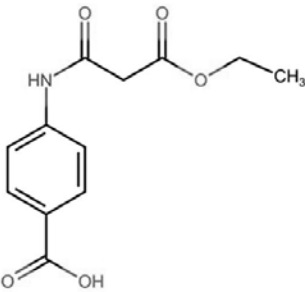
Сходство химической структуры производных малоновой кислоты малобена и этмабена позволяет предположить близость их фармакологического профиля, например, этмабен демонстрирует также гепатотропный эффект, характерный для малобена [26, 32]. Помимо кардиотропного действия, этмабен продемонстрировал нефропротективные свойства при моделировании ишемии почки [37, 104, 106, 108, 109]. После применения этмабена было зафиксировано снижение концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови, а также увеличение скорости клубочковой фильтрации без изменения диуреза [108].

Результаты доклинических исследований подтверждают эффективность и безопасность препарата малобена, что позволяет перейти к фазе I клинических исследований препарата этмабена у здоровых добровольцев [40, 110].

1.4 Методики определения малобена и этмабена

Малобен и этмабен являются производными малоновой кислоты. При этом малобен (4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия) является натриевой солью диамидодибензойной кислоты, где пропандиамидный фрагмент связан с остатками ионизированной бензойной кислоты, что обеспечивает хорошую растворимость малобена в воде и высокую полярность. Этмабен (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота) – амидное производное 4-аминобензойной кислоты. Наличие свободной карбоксильной группы в структуре этмабена обуславливает pH-зависимую ионизацию. Как в малобене, так и в этмабене содержатся ароматические фрагменты, амидные, карбонильные группы. Данные особенности изучаемых ПМК, а также различия в других функциональных группах, в т.ч. свободных карбоксильных группах, обуславливают физико-химические свойства малобена и этмабена.

Таблица 1 – Сравнительная таблица физико-химических параметров малобена и этмабена

Наименование	Малобен (4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия)	Этмабен (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота)
Структурная формула		
pKa	4,2; 4,8; 11,6	4,3; 12,1; 10,2
logP	-0,619	1,276

Экспериментально установленные значения pKa для малобена составили 5,0 и 7,2, что говорит о слабых кислотных свойствах данного соединения [111]. В таблице 1 представлено сравнение структуры малобена и этмабена, а также приведены предсказанные с помощью веб-сервиса «Xundrug» физико-химические свойства данных соединений. Предсказанные значения pKa также подтверждают наличие слабых кислотных центров в молекуле малобена (значения pKa 4,2 и 4,8), также имеется слабый основной центр (значение pKa 11,6). По рассчитанным значениям pKa для этмабена также можно сделать вывод о наличии слабой кислотной группы (значение pKa 4,3), также имеются основные центры (значения pKa 12,1 и 10,2), при этом выраженность основных свойств этмабена выше по сравнению с малобеном. По рассчитанным значениям logP (таблица 1) можно сделать вывод о существенных различиях в липофильности: малобен имеет $\log P < 0$, что указывает на гидрофильные свойства, этмабен имеет $\log P > 0$, что характеризует данное соединение как липофильное.

Литературный обзор опубликованных методик определения малобена и этмабена представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Литературный обзор методик определения малобена и этмабена

Метод	Назначение методики	Неподвижная фаза	Подвижная фаза		Режим элюирования	Примечание	Ссылки
			Элюент А	Элюент В			
ВЭЖХ-УФ	Контроль примесей, включая примесь этмабена, в субстанции малобена	ProntoSIL 120-5-C18 AQ (75×2 мм, 5 мкм)	фосфатный буферный раствор (pH = 2,8)	Метанол	Градиентный (30% → 80% эл. В, 20 мин)	Аналитическая область: 0,1–1,2 мкг/мл	[111, 112]
ВЭЖХ-УФ	Количественное определение малобена в таблетках	ProntoSIL 120-5-C18 AQ (75×2 мм, 5 мкм)	0,02% водный раствор о-фосфорной кислоты в (pH = 2,6)	Метанол	Градиентный (40% → 70% эл. В, 8 мин)	–	[113]
ВЭЖХ-УФ	Определения примесей, включая примесь малобена, в субстанции этмабена	Luna C18, (250×4,6 мм, 5 мкм)	0,1% водный раствор фосфорной кислоты	Ацетонитрил	Градиентный (20% → 45% эл. В, 15 мин)	–	[114, 115]
ВЭЖХ-УФ	Определение родственных примесей в СО, АФС и таблетках малобена и этмабена	Luna C18, (250×4,6 мм, 5 мкм)	0,1% водный раствор фосфорной кислоты	Ацетонитрил	Градиентный (15% → 60% эл. В, 20 мин)	–	[116]
ВЭЖХ-МС	Определение малобена в биообразцах животных	Kromasil 60-5CN (150×4 мм, 5 мкм)	–	–	–	Аналитический диапазон: 2–100 нг/мл.	[87]

Продолжение Таблицы 2

ВЭЖХ-МС	Определение малобена в образцах плазмы и мочи	Zorbax Plus CN (150×4,6 мм, 5 мкм)	1,0% водный раствор муравьиной кислоты	Ацетонитрил	Изократический (30% эл. В)	Аналитический диапазон: 2–100 нг/мл. Пробоподготовка способом осаждения ацетонитрилом. Детектирование в режиме мониторинга выбранных ионов (341 m/z)	[117]
ВЭЖХ-МС	Определение родственных примесей, включая примесь этмабена, в АФС малобена	Kromasil 100–3.5 C18 (150×2,1 мм, 3,5 мкм)	0,05% водный раствор муравьиной кислоты	Метанол	Изократический (30% эл. В)	–	[118]
Определение методом капиллярного электрофореза родственных примесей в АФС и готовой лекарственной форме малобена, включая примесь этмабена							[119]
Количественное определения малобена в субстанции методом кислотно-основного титрования							[120]
Количественное определения этмабена в субстанции методом кислотно-основного титрования							[114]

В литературных источниках опубликованы аналитические методики определения родственных примесей (включая примесь этмабена) в субстанции и таблетках малобена [111, 112, 113], методика определения примесей (включая примесь малобена) в стандартном образце этмабена [114, 115], а также методика, пригодная для определения родственных примесей в СО, АФС и ГЛФ малобена и этмабена [116]. В данных методиках используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [111-116].

На рисунке 4 представлен пример хроматограммы, полученной при количественном определении малобена в таблетках методом ВЭЖХ-УФ (хроматографическая колонка ProntoSIL 120-5-C18 AQ (75×2 мм, 5 мкм), режим градиентного элюирования) [113]. На рисунке 5 представлен пример хроматограмм, полученных в рамках определения примесей в субстанции малобена при анализе методом ВЭЖХ-УФ (хроматографическая колонка ProntoSIL 120-5-C18 AQ (75×2 мм, 5 мкм), режим градиентного элюирования) [111]. На рисунке 6 представлен образец ВЭЖХ-УФ хроматограммы в рамках исследования по определению примесей в субстанции этмабена (хроматографическая колонка Luna C18, (250×4,6 мм, 5 мкм), режим градиентного элюирования) [114].

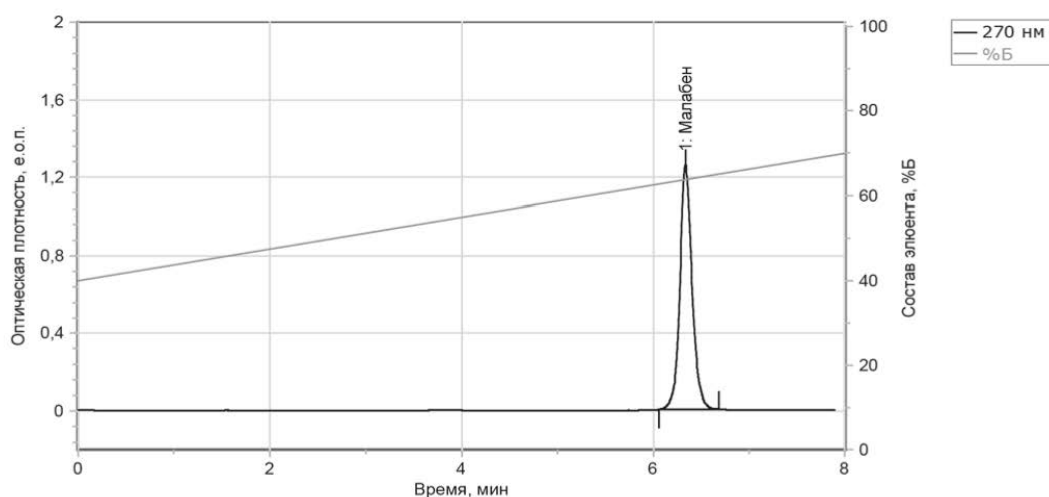


Рисунок 4 – Пример хроматограммы, полученной при анализе испытуемого раствора таблеток малобена методом ВЭЖХ-УФ [113]

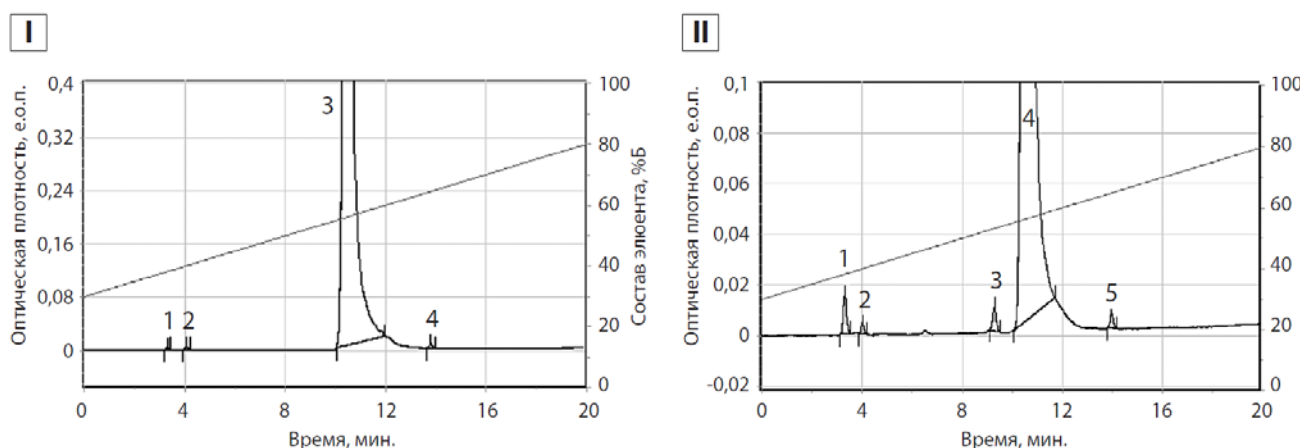


Рисунок 5 – Пример хроматограмм, полученных при анализе образцов, в рамках ВЭЖХ-УФ исследования родственных примесей в субстанции малобена (I – испытуемый раствор, где пик 3 – малобен; II – испытуемый раствор с добавкой специфических примесей, где пик 3 – этмабен, пик 4 – малобен) [111]

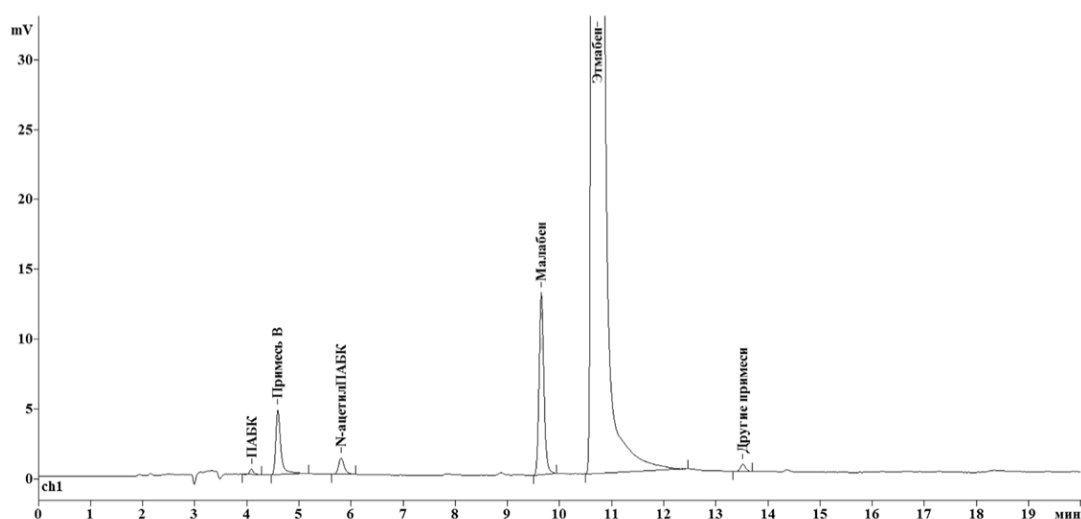


Рисунок 6 – Пример хроматограммы, полученной при анализе испытуемого раствора этмабена в рамках исследования родственных примесей в субстанции этмабена методом ВЭЖХ-УФ [114]

Опубликована методика определения родственных примесей в АФС малобена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) [118]. Также разработаны методики количественного определения малобена и этмабена в субстанциях с помощью кислотно-основного титрования [114, 120] и методика определения в АФС и ГЛФ малобена родственных примесей, включая примесь этмабена, методом капиллярного электрофореза [119]. Данные методики применимы для контроля качества СО,

АФС и ГЛФ малобена и этмабена, однако не могут использоваться в биоаналитических исследованиях. В литературных источниках приводится информация о ВЭЖХ-МС-методиках определения малобена в биообразцах (плазма и моча) лабораторных животных [87, 117]. С помощью данных биоаналитических методик проводилось количественное определение малобена в биообразцах животных в рамках доклинических исследований по изучению фармакокинетики [87, 117]. Однако они не пригодны для использования в рамках I фазы КИ по изучению фармакокинетики малобена у человека, поскольку оцененные в процессе валидации параметры не соответствуют требованиям Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, распространяющихся на данный тип исследований. Также аналитический диапазон для малобена в данных методиках составляет 2–100 нг/мл [87, 117], данный диапазон является недостаточно широким для использования в рамках исследования по изучению фармакокинетики малобена у человека в рамках I фазы с эскалацией дозы. Параметры методик количественного определения этмабена в биообразцах не опубликованы [105].

Анализ опубликованных методик определения малобена и этмабена подчеркивает необходимость разработки методики определения малобена в биообразцах человека и методики определения этмабена в биообразцах человека, которые будут пригодны для использования в рамках исследований фармакокинетики малобена и этмабена у человека в рамках проведения I фаз КИ является необходимым.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. МАЖБП тесно связана с метаболическим синдромом и относится к одному из наиболее распространенных заболеваний печени с высоким риском прогрессирования вплоть до гепатоцеллюлярной карциномы. Для эффективной терапии МАЖБП необходим комплексный подход, направленный на устранение ключевых звеньев патогенеза. Перспективным направлением в лечении МАЖБП

является применение препаратов с метаболическим, гиполипидемическим и антистеатозным действием.

2. Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной смертности во всем мире. Доминирующее место в структуре заболеваний сердечно-сосудистой системы занимает ИБС, что обуславливает необходимость поиска новых подходов к лечению ишемических и метаболических нарушений миокарда.

3. В связи с тем, что существующие подходы к терапии МАЖБП и ИБС не в полной мере обеспечивают воздействие на патогенез данных заболеваний, сохраняется потребность в разработке новых препаратов с метаболической активностью.

4. Производные малоновой кислоты продемонстрировали широкий спектр фармакологической активности. Малобен рассматривается как потенциальное средство для терапии МАЖБП, этмабен – для лечения ИБС.

5. В доклинических исследованиях были подтверждены эффективность и безопасность малобена и этмабена у лабораторных животных, однако данные соединения не изучались ранее в ходе клинических исследований, их фармакокинетика у человека также не изучена. В связи с чем есть необходимость клинического изучения препаратов малобена и этмабена у здоровых добровольцев в рамках проведения I фазы КИ. Для проведения фармакокинетических исследований малобена и этмабена необходима разработка биоаналитических методик количественного определения в образцах человека, соответствующих актуальным регуляторным требованиям и пригодных для проведения данного типа исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Количественное определение малобена в биообразцах человека методом ВЭЖХ-МС/МС

2.1.1 Оборудование и программное обеспечение

Количественное определение малобена в образцах плазмы крови человека проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Аналитическое оборудование включало:

- ✓ блок управления (контроллер), модель CBM-20A;
- ✓ автоматический дегазатор, модель DGU-20A3R;
- ✓ насос, модель LC-20ADXR;
- ✓ автодозатор, модель SIL-20ACXR;
- ✓ устройство автоматической подачи образцов в автодозатор, модель Rack Changer II;
- ✓ термостат колонок для поддержания температур выше комнатной, модель CTO-20A;
- ✓ ультрафиолетовый детектор, модель SPD-20A UFLC;
- ✓ переключающий кран высокого давления, модель FCV-20AH2.

Первичную обработку результатов анализа проводили в программном обеспечении «LabSolutions», версия 5.91 (Shimadzu Corporation, Япония).

Биологические образцы, СО, АФС и серии стандартных растворов хранились при заданных температурных режимах в следующих морозильных и холодильных камерах:

- ✓ медицинская морозильная камера, модель MM-180/20/35 (АО «ПОЗиС», Россия);
- ✓ медицинская морозильная камера вертикального типа, модель ММШ-350 (АО «ПОЗиС», Россия);
- ✓ медицинская низкотемпературная морозильная камера, модель DW-HL100 (Hefei Meiling, Китай);

✓ фармацевтическая холодильная камера ХФ-400-2 (АО «ПОЗиС», Россия).

Взятие точных навесок для приготовления стандартных растворов проводили с помощью аналитических весов 1 класса точности, модель GR-200 (A&D Company Ltd., Япония).

При пробоподготовке образцов к анализу были использованы: одноканальные дозаторы переменного объема «Sartorius mLine» 100–1000 мкл (АО «Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг», Финляндия); «Техно» 1–10 мл, 10–100 мкл и 100–1000 мкл, «Блэк» 500–5000 мкл, «Лайт» 10–100 мкл (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия); электронные степперы (мультидозаторы) Multipette E3/ E3x (Eppendorf, Германия); вортекс-шейкеры Reax top (Heidolph, Германия); центрифуги CM-50M (СИА «ЭЛМИ», Латвия), Thermo IEC MicroCL 17 (Thermo Electron, Германия) и Mikro 185 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия).

В приготовлении элюентов подвижной фазы также были задействованы деминерализатор Hydrolab R5 (Hydrolab, Польша) и ультразвуковая ванна 5DT (Stegler, Китай).

Генерации осушающего и распыляющего газов осуществлялась с помощью системы воздухоподготовки, состоящей из:

- ✓ ресивера P270.11.04 (ЗАО «Ремеза», Беларусь);
- ✓ осушителя (НПК «Промтегра», Россия);
- ✓ компрессора спирального КСЗ-10-270А (ЗАО «Ремеза», Беларусь);
- ✓ генератора азота S-100 (НПК «Промтегра», Россия).

2.1.2 Используемые реактивы, стандартные и биологические образцы

В приготовлении исходных, рабочих и промежуточных стандартных растворов малобена была использована АФС малобена с количественным содержанием 100,40%, синтезированная в Отделе синтеза ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России. Для приготовления исходного стандартного раствора и рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта (ВС) использовался СО

прометазина гидрохлорида с количественным содержанием 99,90% (Эталонный стандарт Фармакопеи США, Франция).

Были использованы: метанол особо чистый для градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (ТД «Химмед», Россия), ацетонитрил химически чистый (ООО «Компонент-Реактив», Россия), ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Biosolve, Франция), вода деминерализованная I класса и муравьиная кислота с чистотой 98% (PanReac, Германия & AppliChem, Испания).

Для приготовления модельных образцов была использована интактная плазма крови человека, хилезная интактная плазма крови и гемолизная интактная плазма крови (из шести независимых источников, заведомо не содержащая анализируемые вещества). В ходе проведения апробации методики определения малобена в плазме крови и аналитического этапа исследования по протоколу клинического исследования № СРНУ-4DN-01-2022 использовалась плазма крови здоровых добровольцев, принимающих участие в данном исследовании и подписавших информированное согласие. Образцы плазмы крови здоровых добровольцев были предоставлены клиническим центром. В качестве антикоагулянта в данных видах матрицы была использована добавка трикальевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ($K_3ЭДТА$).

2.1.3 Используемые растворы

В методике количественного определения малобена плазме крови в качестве подвижной фазы использовались следующие растворы подвижной фазы: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А, по объему), 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В, по объему). Также были использованы стандартные растворы малобена и прометазина нескольких серий:

- *Серия стандартных растворов № 1* была использована в предварительных работах по выбору значений аналитического диапазона методики количественного определения малобена в плазме. Для этого использовались

исходный стандартный раствор малобена, рабочие стандартные растворы малобена, а также исходный и рабочий стандартный растворы прометазина.

- *Серия стандартных растворов № 2* использовалась в процессе проведения валидационного этапа исследования, а также в ходе апробации методики и проведения аналитической части биоаналитического исследования, выполняющегося согласно протоколу клинического исследования № СРНУ-4DN-01-2022. Для этого были использованы исходный и промежуточный стандартные растворы малобена, рабочие стандартные растворы малобена, а также исходный и рабочий стандартный растворы ВС прометазина.

Растворы подвижной фазы хранились при комнатной температуре в течение не более 14 и 90 дней соответственно. Серии стандартных растворов хранились в морозильной камере при температуре $-42,5 \pm 7,5$ °С в течение не более 149 дней.

2.1.4 Приготовление растворов

2.1.4.1 Приготовление растворов подвижной фазы для ВЭЖХ-МС/МС

Приготовление элюента А (0,1 % (об./об.) раствор муравьиной кислоты в воде):

1. в мерную колбу (объемом 1000,0 мл) вносили около 500 мл воды I класса;
2. с помощью механического одноканального дозатора отбирали 1000 мкл муравьиной кислоты и переносили в колбу и перемешивали;
3. доводили объем колбы до заданного объема водой I класса и перемешивали;
4. дегазировали в ультразвуковой ванне при температуре 25 °С в течение 15 минут.

Приготовление элюента В (0,1 % (об./об.) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле):

1. в мерную колбу (объем 1000,0 мл) вносили около 500 мл ацетонитрила для градиентной ВЭЖХ;

2. с помощью механического одноканального дозатора отбирали 1000 мкл муравьиной кислоты и переносили в колбу и перемешивали;

3. доводили объем колбы до заданного объема ацетонитрилом для градиентной ВЭЖХ и перемешивали.

2.1.4.2 Приготовление стандартных растворов

Стандартные растворы, предназначенные для проведения предварительной оценки с целью определения аналитического диапазона методики (серия № 1):

1. *Исходный стандартный раствор малобена* ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$): точную навеску 11,2 мг АФС малобена (что эквивалентно 10,0 мг 4,4'-(пропандиамидо)дибензойной кислоты с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), доводили до заданного объема и перемешивали.

2. *Рабочие стандартные растворы малобена*: аликвоты исходного стандартного раствора малобена ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$), отобранные электронным степпером, переносили в мерные колбы (объемом 10,000 мл, 20,00 мл, 50,00 мл и 100,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали. Концентрации рабочих стандартных растворов малобена, объемы мерных колб и объемы аликвот исходного стандартного раствора малобена представлены также представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Приготовление рабочих стандартных растворов малобена (серия № 1)

Раствор №	Концентрация рабочего стандартного раствора малобена, нг/мл	Объем мерной колбы, мл	Объем аликвоты исходного стандартного раствора малобена, мкл
1	20,00	100,00	10
2	200,00	50,00	50
3	1000,00	20,00	100
4	2000,00	20,00	200
5	5000,00	10,000	250
6	10000,00	10,000	500

Продолжение Таблицы 3

7	15000,00	10,000	750
8	20000,00	10,000	1000
9	60,00	50,00	15
10	3000,00	20,00	300
11	12000,00	20,00	1200
12	16000,00	20,00	1600

3. *Исходный стандартный раствор ВС прометазина* ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$): точную навеску 11,3 мг СО прометазина гидрохлорида (что эквивалентно 10,0 мг прометазина с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), доводили до заданного объема и перемешивали.

4. *Рабочий стандартный раствор ВС прометазина* ($C = 31,500 \text{ мкг/мл}$): электронным степпером обирали 7875 мкл исходного стандартного раствора прометазина ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$), переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали.

Стандартные растворы предназначенная для использования в ходе валидационного и аналитического этапов исследования (серия № 2):

1. *Исходный стандартный раствор малобена* ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$): точную навеску 11,2 мг АФС малобена (что эквивалентно 10,0 мг 4,4'-(пропандиамидо)дibenзойной кислоты с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), доводили до заданного объема и перемешивали.

2. *Промежуточный стандартный раствор малобена* ($C = 10,000 \text{ мкг/мл}$): аликвоту 2500 мкл исходного стандартного раствора малобена ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$), отобранную электронным степпером, переносили в мерную колбу

(объемом 50,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали.

3. *Рабочие стандартные растворы малобена:* аликвоты промежуточного стандартного раствора малобена ($C = 10,000$ мкг/мл), отобранные электронным степпером, переносили в мерные колбы (объемом 10,000 мл, 20,00 мл, 25,00 мл и 50,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали. Концентрации рабочих стандартных растворов малобена, объемы мерных колб и объемы аликвот промежуточного стандартного раствора малобена представлены также представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Приготовление рабочих стандартных растворов малобена (серия № 2)

Раствор №	Концентрация рабочего стандартного раствора малобена, нг/мл	Объем мерной колбы, мл	Объем аликвоты промежуточного стандартного раствора малобена, мкл
1	15,00	50,00	75
2	20,00	50,00	100
3	50,00	20,00	100
4	100,00	20,00	200
5	200,00	10,000	200
6	500,00	10,000	500
7	1000,00	10,000	1000
8	2000,00	10,000	2000
9	2500,00	10,000	2500
10	3000,00	10,000	3000
11	45,00	25,00	113
12	150,00	25,00	375
13	600,00	20,00	1200
14	1500,00	20,00	3000
15	2400,00	10,000	2400

4. *Исходный стандартный раствор ВС прометазина* ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$): точную навеску 11,3 мг СО прометазина гидрохлорида (что эквивалентно 10,0 мг прометазина с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), далее раствор доводили до заданного объема и перемешивали.

5. *Рабочий стандартный раствор ВС прометазина* ($C = 2100,00 \text{ нг/мл}$): электронным степпером отбирали 525 мкл исходного стандартного раствора прометазина ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$), переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали.

2.1.5 Приготовление биологических образцов к анализу

Приготовление проб к анализу осуществлялось путем осаждения ацетонитрилом в соотношении матрица/осадитель 1:2. Готовились холостые образцы, модельные образцы (калибровочные образцы, образцы контроля качества, образцы без влияния биологической матрицы, образцы без учета влияния степени извлечения из биологической матрицы), а также образцы проб от добровольцев.

Рабочие стандартные растворы малобена серии № 1, соответствующие номерам № 1–8 (таблица 3) использовались для приготовления калибровочных уровней, растворы № 1, 9–12 (таблица 3) – для приготовления образцов контроля качества, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, H. Рабочие стандартные растворы малобена серии № 2, соответствующие номерам № 1–10 (таблица 4) использовались для приготовления калибровочных уровней, растворы № 1, 11–15 (таблица 4) – для приготовления образцов контроля качества, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, M3, H. Концентрации малобена в модельных образцах после пробоподготовки представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Концентрации малобена в модельных образцах плазмы крови

Кодировка	Концентрация малобена, нг/мл	
	Серия № 1 («Оценочный» диапазон)	Серия № 2 (Диапазон № 1)
0	0,00	0,00
1	1,00	0,75
2	10,00	1,00
3	50,00	2,50
4	100,00	5,00
5	250,00	10,00
6	500,00	25,00
7	750,00	50,00
8	1000,00	100,00
9	–	125,00
10	–	150,00
LLOQ	1,00	0,75
L	3,00	2,25
M1	150,00	7,50
M2	600,00	30,00
M3	–	75,00
H	800,00	120,00

Концентрация ВС прометазина в образцах серии № 1 составляла 1500,00 нг/мл, серии № 2 – 100,00 нг/мл.

Приготовление образцов контроля качества и калибровочных образцов малобена осуществлялось следующим образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 190 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;
2. с помощью механического одноканального дозатора добавляли 10 мкл соответствующего рабочего раствора малобена до получения образца с заданной концентрацией;

3. с помощью электронного степпера добавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС прометазина (кроме образцов, заведомо не содержащих ВС);

4. с помощью электронного степпера добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;

5. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;

6. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в виалы.

Холостые образцы готовились следующим образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 200 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;

2. с помощью электронного степпера добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;

3. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;

4. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в виалы.

С целью проверки пригодности СО готовили модельный образец на уровне верхнего предела количественного определения (ВПКО) без добавления ВС:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 190 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;

2. с помощью механического одноканального дозатора добавляли 10 мкл рабочего раствора малобена, соответствующего калибровочному раствору № 10;

3. с помощью электронного степпера добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;

4. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;

5. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в виалы.

Модельные образцы без влияния биологической матрицы готовились как образцы контроля качества и калибровочные образцы, однако в пробирки вместо интактной плазмы крови аликвотировали по 190 мкл воды I класса.

Приготовление модельных образцов без учета влияния степени извлечения из биологической матрицы осуществлялось следующим образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 380 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;
2. с помощью электронного степпера добавляли 800 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;
3. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;
4. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут);
5. с помощью механического одноканального дозатора переносили 590 мкл надосадочной жидкости в вials;
6. с помощью механического одноканального дозатора добавляли 10 мкл соответствующего рабочего раствора малобена;
7. с помощью электронного степпера добавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС прометазина;
8. перемешивали образцы с помощью вортекс-шейкера.

Приготовление образцов плазмы крови добровольцев к анализу осуществляли таким образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 200 мкл плазмы крови добровольца в микропробирку типа «Eppendorf»;
2. с помощью электронного степпера добавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС прометазина;
3. с помощью электронного степпера добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;
4. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;
5. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в вials.

2.1.6 Параметры ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения малобена

2.1.6.1 Хроматографические параметры

В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографическая колонка Phenomenex Luna C18(2) (5 мкм, 50,00×2,00 мм). Также в хроматографической системе была установлена предколонка Phenomenex C18 (4,00×3,00 мм). В термостате колонки поддерживалась постоянная температура на уровне 40 °С. Для элюирования готовилась подвижная фаза (ПФ): 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле, приготовленные по объему, скорость потока – 1 мл/мин [121].

Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования при постоянной скорости потока подвижной фазы, составляющей 1,00 мл/мин. Градиент ПФ: 0,00-0,50 мин – 10% элюента В, 0,50-1,50 мин – 10% → 100% элюента В, 1,50-2,50 мин – 100% элюента В, 2,50-2,60 мин – 100% → 10% элюента В, 2,60-4,00 мин – 10% элюента В. Объем ввода пробы составил 10 мкл. Время регистрации хроматограммы составило 4,00 минуты [121].

2.1.6.2 Масс-спектрометрические параметры

Детектирование сигналов малобена и прометазина в масс-детекторе также проводилось путем мониторинга множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Для ионизации молекул малобена и прометазина был выбран источник электроспрей-ионизации (ESI, electrospray ionization) [121].

Параметры источника ионизации:

- ✓ скорость подачи осушающего и распыляющего газа 20 л/мин и 3 л/мин соответственно;
- ✓ температура линии десольватации и блока нагрева 250 °С и 400 °С соответственно [121].

Ионизация малобена осуществлялась в отрицательном режиме, прометазина – в положительном. Напряжение на игле капилляра источника ионизации составило -5,0 кВ для малобена и +4,5 кВ для прометазина. Были

зафиксированы следующие MRM-переходы: 341,15 → 118,05 m/z (энергия соударения (collision energy, CE) 28,5 кВ), 341,15 → 162,20 m/z (CE 14,7 кВ), 341,15 → 136,10 m/z (CE 20,2 кВ) – для малобена; 285,15 → 198,05 m/z (CE -35,0 кВ) – для прометазина [121].

2.2 Валидация методики количественного определения малобена в плазме крови человека

Валидация биоаналитической методики количественного определения малобена с целью подтверждение ее пригодности для определения малобена в плазме крови человека проводилась в соответствии с требованиями следующей нормативной документации:

1) Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС (утверждены решением №85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.) [122].

2) Guideline on Bioanalytical Method Validation., European Medicines Agency (EMA), 2012 [123].

3) Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry, U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2018 [124].

Была проведена полная валидация методики количественного определения малобена в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Проводилась оценена следующих валидационных параметров: линейность, правильность, прецизионность, НПКО, селективность, пригодность СО, матричный эффект, степень извлечения, перенос пробы, стабильность [121].

2.3 Изучение фармакокинетики малобена

2.3.1 Клиническое исследования малобена

Исследование фармакокинетики препарата малобена проводились в рамках фазы I клинического исследования согласно протоколу клинического исследования № СРНУ-4DN-01-2022 «Открытое нерандомизированное клиническое исследование по оценке безопасности, переносимости и

фармакокинетических параметров различных доз препарата Малобен, таблетки (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев». Проведение исследования было одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации, было получено разрешение на проведение клинического исследования № 717 от 23 декабря 2022 года [93].

В клиническом исследовании малобена были рандомизированы 24 здоровых добровольца (мужчины и женщины в возрасте от 18 до 65 лет, которые имеют верифицированный диагноз «здоров», соответствуют всем остальным критериям включения и не соответствуют ни одному критерию исключения), подписавшие информированное согласие [93].

Исследование включало в себя два этапа:

- в рамках этапа I изучалось однократное применение препарата малобена: добровольцы когорты 1 получали по 60 мг малобена однократно, когорты 2 – по 120 мг однократно, когорты 3 – по 180 мг однократно;
- в рамках этапа II изучалось многократное применение препарата малобена: добровольцы когорты 4 получали суточную дозу 60 мг (1 таблетка 60 мг один раз в сутки), когорты 5 – суточную дозу 120 мг (1 таблетка 60 мг два раза в сутки с интервалом 6 часов), когорты 6 – суточную дозу 180 мг (1 таблетка 60 мг три раза в сутки с интервалом 4 часа). В этапе II исследования принимали участие добровольцы, успешно завершившие этап I и не попадающие под критерии исключения [93].

Отбор цельной крови на первом этапе исследования проходил за 5–10 мин до приема исследуемого препарата (0 ч), через 20 мин, 30 мин; 1 ч; 1 ч 30 мин; 2 ч; 2 ч 30 мин; 3 ч; 3 ч 30 мин; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 12 ч; 16 ч; 24 ч; 36 ч; 48 ч; 72 ч после приема исследуемого препарата. На втором этапе отбор цельной крови проходил за 5–10 мин до первого приема препарата (0 ч), через 20 мин, 30 мин; 1 ч; 1 ч 30 мин; 2 ч; 2 ч 30 мин; 3 ч; 3 ч 30 мин; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 12 ч; 16 ч; 24 ч; 36 ч; 48 ч; 72 ч после последнего приема исследуемого препарата [93].

С целью получения плазмы для анализа образцы цельной крови, отобранные в пробирки с антикоагулянтом K_3EDTA центрифугировались при 3000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4°C.

Отбор цельной крови и преаналитический этап пробоподготовки осуществлялся в клиническом центре.

2.3.2 Статистический этап исследования малобена

Индивидуальные профили изменения значений концентраций малобена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после однократного и многократного приема препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), характеризовались следующими фармакокинетическими параметрами:

1. C_{max} – максимальная концентрация малобена в плазме крови;
2. t_{max} – время достижения максимальной концентрацией малобена в плазме крови;
3. $AUC_{(0-t)}$ – площадь под кривой «концентрация – время» с момента приема исследуемого препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ;
4. $AUC_{(0-\infty)}$ – площадь под кривой «концентрация – время» с момента приема исследуемого препарата до бесконечности.

Дополнительно был проведен расчет следующих параметров:

- ✓ $t_{1/2}$ – период полувыведения малобена;
- ✓ k_{el} – константа скорости терминальной элиминации малобена;
- ✓ MRT (Mean Residence Time) – среднее время удерживания малобена в плазме;
- ✓ V_d – кажущийся объем распределения;
- ✓ Cl – клиренс [93].

Для каждого из вышеперечисленных показателей рассчитывались значения описательной статистики (определение максимальных и минимальных значений,

средних арифметических и геометрических, стандартного отклонения для среднего, медианы) [93, 125-127].

Дополнительно проводилась оценка пропорциональности основных фармакокинетических (ФК) параметров ($C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$) и дозы с использованием степенной модели [93, 128, 129]:

$$Y = \alpha \times \text{Dose}^{\beta},$$

где Y – ФК параметр, α – константа, β – коэффициент дозовой пропорциональности [93, 128, 129].

После логарифмического преобразования модель приводилась к линейному виду:

$$\ln(Y) = \ln(\alpha) + \beta \times \ln(\text{Dose}) + \varepsilon,$$

где ε – случайная ошибка [93, 128, 129].

Параметр β интерпретировался как показатель дозовой пропорциональности: значение $\beta=1$ соответствует линейной зависимости между дозой и ФК параметром. Дозовая пропорциональность считалась подтвержденной, если 90% доверительный интервал (ДИ) для β лежал в пределах критической области, рассчитанной как:

$$\left[1 + \frac{\ln(Q_L)}{\ln(R)}; 1 + \frac{\ln(Q_U)}{\ln(R)}\right],$$

где R – отношение наибольшей и наименьшей изучаемых доз ($R=3$); Q_L – нижняя граница ($Q_L = 0,5$); Q_U – верхняя граница ($Q_U = 2,0$) [93, 128, 129].

2.3.3 Оборудование и программного обеспечение

Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью пакета Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США), статистическая обработка результатов и построение графиков была произведена с помощью программного обеспечения «The R Project for Statistical Computing», версия 4.4.2 [93].

2.4 Количественное определение этмабена в биообразцах человека методом ВЭЖХ-МС/МС

2.4.1 Оборудование и программное обеспечение

В ходе проведения количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС использовали следующее оборудование:

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera XR с детектором LCMS-8040, блок управления (контроллер), CBM-20A; автоматический дегазатор, DGU-20A3R; насос, LC-20ADXR; автодозатор, SIL-20ACXR; устройство автоматической подачи образцов в автодозатор, Rack Changer II; термостат колонок для поддержания температур выше комнатной, CTO-20A; ультрафиолетовый детектор, SPD-20A UFLC; переключающий кран высокого давления, FCV-20AH2 (Shimadzu Corporation, Япония);
- медицинская морозильная камера, MM-180/20/35 (АО «ПОЗиС», Россия); медицинская морозильная камера вертикального типа, MMШ-350 (АО «ПОЗиС», Россия); медицинская низкотемпературная морозильная камера, DW-HL100 (Hefei Meiling, Китай); фармацевтическая холодильная камера XF-400-2 (АО «ПОЗиС», Россия);
- аналитические весы 1 класса точности, GR-200 (A&D Company Ltd., Япония);
- одноканальные дозаторы переменного объема «Sartorius mLine» 100–1000 мкл (АО «Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг», Финляндия); «Техно» 1–10 мл, 10–100 мкл и 100–1000 мкл, «Блэк» 500–5000 мкл, «Лайт» 10–100 мкл (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия); электронные степперы (мультидозаторы) Multipette E3/ E3x (Eppendorf, Германия);
- вортекс-шейкеры Reax top (Heidolph, Германия);
- центрифуги CM-50M (СИА «ЭЛМИ», Латвия), Thermo IEC MicroCL 17 (Thermo Electron, Германия) и Mikro 185 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия).
- деминерализатор Hydrolab R5 (Hydrolab, Польша);

- ультразвуковая ванна 5DT (Stegler, Китай);
- система воздухоподготовки (Промтегра, Россия), состоящая из ресивера P270.11.04 и компрессора спирального КСЗ-10-270А (ЗАО «Ремеза», Беларусь), осушителя и генератора азота S-100 (НПК «Промтегра», Россия).

Обработка первичных данных была проведена в программе «LabSolutions», версия 5.91 (Shimadzu Corporation, Япония).

2.4.2 Используемые реактивы, стандартные и биологические образцы

При проведении биоаналитического исследования этмабена были использованы:

- АФС этмабена, количественное содержание 99,50% (Отдел синтеза ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России);
- СО прометазина гидрохлорида, количественное содержание 99,90% (Эталонный стандарт Фармакопеи США, Франция);
- ацетонитрил химически чистый (ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Biosolve, Франция);
- метанол особо чистый для градиентной ВЭЖХ (ТД «Химмед», Россия);
- вода деминерализованная I класса;
- муравьиная кислота 98% (PanReac, Германия & AppliChem, Испания).

В приготовлении модельных образцов были использованы образцы интактной плазмы, не содержащие этмабен и прометазин: по 6 образцов интактной плазмы крови человека (интактная плазма, хилезная интактная плазма, гемолизная интактная плазма) с K_3 ЭДТА в качестве антикоагулянта. Также в исследовании была использована плазма крови здоровых добровольцев, включенных в клиническое исследование, проводимое согласно протоколу клинического исследования № СРНУ-4DN-01-2022 и подписавших информированное согласие. Данные образцы были получены из клинического центра, в котором осуществлялся отбор биообразцов.

2.4.3 Используемые растворы

В качестве подвижной фазы были использованы 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В).

Использовалось несколько серий стандартных растворов:

✓ Серия растворов № 1 использовалась при выборе аналитического диапазона методики.

✓ Серия растворов № 2, соответствующая аналитическому диапазону № 1, была использована в ходе валидационного этапа исследования при проведении полной валидации методики определения этмабена в плазме крови, а также в процессе аналитического этапа исследования.

✓ Серия растворов № 3, соответствующая аналитическому диапазону № 2, была использована в ходе проведения частичной валидации методики в связи с необходимостью изменения аналитического диапазона методики, а также в процессе аналитического этапа исследования.

Элюент А хранился при комнатной температуре в течение не более 14 дней, элюент В – при комнатной температуре в течение не более 90 дней. Стандартные растворы хранились при температуре $-42,5 \pm 7,5$ °С в течение не более 112 дней.

2.4.4 Приготовление растворов

2.4.4.1 Приготовление растворов подвижной фазы для ВЭЖХ-МС/МС

Растворы подвижной фазы (0,1% раствора муравьиной кислоты в воде и 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле) готовили по объему: мерную колбу (объемом 1000,0 мл) заполняли водой I класса/ ацетонитрилом, с помощью механического одноканального дозатора аликвотировали 1000 мкл муравьиной кислоты, содержимое перемешивали и доводили до заданного объема растворителем (водой I класса/ ацетонитрилом) и перемешивали. Водный элюент перед использованием проходил дополнительную дегазацию в ультразвуковой ванне в течение 15 минут при комнатной температуре.

2.4.4.2 Приготовление стандартных растворов для исследования этмабена

Приготовление стандартных растворов, предназначенных для предварительной оценки аналитического диапазона (серия № 1):

1. *Исходный стандартный раствор этмабена* ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$): точную навеску 10,1 мг АФС этмабена (что эквивалентно 10,0 мг этмабена с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), доводили до заданного объема и перемешивали.

2. *Рабочие стандартные растворы этмабена*: аликвоты исходного стандартного раствора этмабена ($C = 200,000 \text{ мкг/мл}$), отобранные электронным степпером, переносили в мерные колбы (объемом 10,000 мл, 20,00 мл, 50,00 мл и 100,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали. Концентрации рабочих стандартных растворов этмабена, объемы мерных колб и объемы аликвот исходного стандартного раствора этмабена представлены также представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Приготовление рабочих стандартных растворов этмабена (серия № 1)

Раствор №	Концентрация рабочего стандартного раствора этмабена, нг/мл	Объем мерной колбы, мл	Объем аликвоты исходного стандартного раствора этмабена, мкл
1	100,00	100,00	50
2	200,00	50,00	50
3	1000,00	20,00	100
4	2000,00	20,00	200
5	5000,00	10,000	250
6	10000,00	10,000	500
7	20000,00	10,000	1000
8	30000,00	10,000	1500
9	300,00	50,00	75
10	4500,00	20,00	450
11	18000,00	20,00	1800
12	24000,00	20,00	2400

3. *Исходный стандартный раствор ВС прометазина* ($C = 200,000$ мкг/мл): точную навеску 11,3 мг СО прометазина гидрохлорида (что эквивалентно 10,0 мг прометазина с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), далее раствор доводили до заданного объема и перемешивали.

4. *Рабочий стандартный раствор ВС прометазина* ($C = 2100,00$ нг/мл): электронным степпером отбирали 525 мкл исходного стандартного раствора прометазина ($C = 200,000$ мкг/мл), переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали.

Стандартные растворы, предназначенные для валидационного и аналитического этапов исследования (серия № 2 и № 3):

1. *Исходный стандартный раствор этмабена* ($C = 1000,000$ мкг/мл): точную навеску 50,3 мг АФС этмабена (что эквивалентно 50,0 мг этмабена с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), далее раствор доводили до заданного объема и перемешивали.

2. *Рабочие стандартные растворы этмабена*: аликвоты исходного стандартного раствора этмабена ($C = 1000,000$ мкг/мл), отобранные электронным степпером, переносили в мерные колбы (объемом 5,000 мл, 10,000 мл, 20,00 мл, 25,00 мл, 50,00 мл, 100,00 мл и 200,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали. Концентрации рабочих стандартных растворов этмабена, объемы мерных колб и объемы аликвот исходного стандартного раствора этмабена представлены также представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Приготовление рабочих стандартных растворов этмабена (серия № 2 и № 3)

Раствор №	Концентрация рабочего стандартного раствора этмабена, мкг/мл	Объем мерной колбы, мл	Объем аликвоты исходного стандартного раствора этмабена, мкл
Серия 2, предназначенная для анализа в рамках аналитического диапазона № 1			
1	5,000	50,00	250
2	10,000	25,00	250
3	20,000	20,00	400
4	100,000	20,00	2000
5	200,000	10,000	2000
6	300,000	10,000	3000
7	400,000	10,000	4000
8	500,000	10,000	5000
9	600,000	10,000	6000
10	15,000	50,00	750
11	30,000	25,00	750
12	90,000	20,00	1800
13	360,000	20,00	7200
14	480,000	20,00	9600
Серия 3, предназначенные для анализа в рамках аналитического диапазона № 2			
1	0,800	200,00	160
2	2,000	50,00	100
3	10,000	50,00	500
4	20,000	25,00	500
5	100,000	25,00	2500
6	200,000	20,00	4000
7	300,000	10,000	3000
8	400,000	10,000	4000
9	500,000	10,000	5000
10	700,000	5,000	3500
11	2,400	50,00	120
12	3,500	50,00	175

Продолжение Таблицы 7

13	35,000	20,00	700
14	105,000	10,000	1050
15	420,000	10,000	4200
16	560,000	5,000	2800

3. *Исходный стандартный раствор ВС прометазина ($C = 200,000$ мкг/мл):* точную навеску 11,3 мг СО прометазина гидрохлорида (что эквивалентно 10,0 мг прометазина с учетом количественного содержания) количественно переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), растворяли в метаноле особо чистом для градиентной ВЭЖХ (около 25 мл), далее раствор доводили до заданного объема и перемешивали.

4. *Рабочий стандартный раствор ВС прометазина ($C = 21,000$ мкг/мл):* электронным степпером отбирали 5250 мкл исходного стандартного раствора прометазина ($C = 200,000$ мкг/мл), переносили в мерную колбу (объемом 50,00 мл), доводили до заданного объема метанолом особо чистым для градиентной ВЭЖХ и перемешивали.

2.4.5 Приготовление биологических образцов к анализу

На этапе пробоподготовки к образцам добавлялся ацетонитрил химически чистый для проведения осаждения и подготовки проб к анализу.

Рабочие стандартные растворы этмабена серии № 1, соответствующие номерам № 1–8 использовались для приготовления калибровочных уровней, растворы № 1, 9–12 – для приготовления образцов контроля качества, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, Н в рамках «оценочного» диапазона.

Рабочие стандартные растворы этмабена серии № 2, соответствующие номерам № 1–9 использовались для приготовления калибровочных уровней, растворы № 1, 10–14 – для приготовления образцов контроля качества, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, M3, Н в рамках аналитического диапазона № 1.

Рабочие стандартные растворы этмабена серии № 3, соответствующие номерам № 1–10 использовались для приготовления калибровочных уровней, растворы № 1,

11–16 – для приготовления образцов контроля качества, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, M3, M4, H в рамках аналитического диапазона № 2.

Концентрации этмабена в модельных образцах представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Концентрации этмабена в модельных образцах плазмы крови

Кодировка	Концентрация этмабена, мкг/мл		
	Серия № 1 («Оценочный» диапазон)	Серия № 2 (Диапазон № 1)	Серия № 3 (Диапазон № 2)
0	0,000	0,000	0,000
1	0,005	0,250	0,040
2	0,010	0,500	0,100
3	0,050	1,000	0,500
4	0,100	5,000	1,000
5	0,250	10,000	5,000
6	0,500	15,000	10,000
7	1,000	20,000	15,000
8	1,500	25,000	20,000
9	–	30,000	25,000
10	–	–	35,000
LLOQ	0,005	0,250	0,040
L	0,015	0,750	0,120
M1	0,225	1,500	0,175
M2	0,900	4,500	1,750
M3	–	18,000	5,250
M4	–	–	21,000
H	1,200	24,000	28,000

Концентрация ВС прометазина в образцах серии № 1 составляла 100,00 нг/мл, серии № 2 и № 3 – 1,000 мкг/мл.

Приготовление образцов контроля качества и калибровочных образцов этмабена осуществлялось следующим образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 190 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;

2. с помощью механического одноканального дозатора добавляли 10 мкл соответствующего рабочего раствора этмабена до получения образца с заданной концентрацией;

3. с помощью электронного степпера добавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС прометазина (кроме образцов, заведомо не содержащих ВС);

4. с помощью электронного степпера добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;

5. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;

6. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в вials.

Холостые образцы готовились следующим образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 200 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;

2. добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;

3. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;

4. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в вials.

Приготовление модельного образца, соответствующих уровню ВПКО без добавления ВС, осуществлялось по следующему алгоритму:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 190 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;

2. с помощью механического одноканального дозатора добавляли 10 мкл рабочего раствора этмабена, соответствующего калибровочному раствору № 9;

3. с помощью электронного степпера добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;

4. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;

5. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в вials.

Приготовление модельных образцов без влияния биологической матрицы осуществлялось согласно алгоритму приготовления образцов контроля качества и калибровочных образцов, однако на первом этапе вместо аликвоты интактной плазмы крови в пробирки добавлялось 190 мкл воды I класса.

Приготовление модельных образцов без учета влияния степени извлечения из биологической матрицы осуществлялось следующим образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 380 мкл интактной плазмы крови в микропробирку типа «Eppendorf»;
2. с помощью электронного степпера добавляли 800 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;
3. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;
4. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут);
5. с помощью механического одноканального дозатора переносили 590 мкл надосадочной жидкости в вials;
6. добавляли 10 мкл соответствующего рабочего раствора этмабена;
7. с помощью электронного степпера добавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС прометазина;
8. перемешивали образцы с помощью вортекс-шейкера.

Приготовление образцов плазмы крови добровольцев к анализу осуществляли таким образом:

1. с помощью механического одноканального дозатора переносили 200 мкл плазмы крови добровольца в микропробирку типа «Eppendorf»;
2. добавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС прометазина;
3. добавляли 400 мкл ацетонитрила химически чистого для осаждения;
4. перемешивали на вортекс-шейкере в течение 10 секунд;
5. отделяли надосадочную жидкость центрифугированием (при 15000 g, 15 минут) и переносили ее в вials.

2.4.6 Параметры ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения этмабена

2.4.6.1 Хроматографические параметры

Этмабен и ВС прометазин элюировались 0,1% раствором муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле в градиентном режиме при скорости потока 1,00 мл/мин. Вещества удерживались на колонке Phenomenex Luna C18(2) (5 мкм, 50,00×2,00 мм). Перед колонкой была установлена предколонка Phenomenex C18 (4,00×3,00 мм). В термостате поддерживалась постоянная температура на уровне 40 °С [25].

Градиент ПФ: 0,00-0,50 мин – 10% элюента В, 0,50-1,25 мин – 10% → 100% элюента В, 1,25-2,50 мин – 100% элюента В, 2,50-2,60 мин – 100% → 10% элюента В, 2,60-4,00 мин – 10% элюента В. Объем ввода пробы составил 20 мкл. Время регистрации хроматограммы составило 4,00 минуты [25].

2.4.6.2 Масс-спектрометрические параметры

Детектирование сигналов этмабена и прометазина на масс-спектрометрическом детекторе проводилось путем регистрации MRM-переходов. Ионизация молекул этмабена и прометазина проводилась с помощью ESI [25].

Были установлены следующие параметры источника ионизации:

- скорость подачи осушающего и распыляющего газа 20 л/мин и 3 л/мин соответственно;
- температура линии десольватации и блока нагрева 200 °С и 400 °С соответственно [25].

Электроспрей-ионизация этмабена проводилась в отрицательном режиме для этмабена и в положительном – для прометазина. Фиксировались следующие MRM-переходы: 249,90 → 160,20 m/z (CE 9,2 кВ), 249,90 → 92,15 m/z (CE 35,6 кВ) – для этмабена; 284,95 → 197,95 m/z (CE -26,6 кВ) – для прометазина. Напряжение на игле капилляра ESI составило -5,0 кВ для этмабена, +4,5 кВ для прометазина [25].

2.5 Валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека

Валидация биоаналитической методики количественного определения этмабена с целью подтверждение ее применимости для определения этмабена в плазме крови человека проводилась в соответствии требованиями нормативной документации, действующей в Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) [122], а также на основании рекомендаций Европейского агентства лекарственных средств [123] и Агентства по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США [124].

Была проведена полная и частичная валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. В рамках проведения полной валидации методики были оценены линейность, правильность, прецизионность, НПКО, селективность, пригодность СО, матричный эффект, степень извлечения, перенос пробы, стабильность. В процессе проведения исследования было обнаружено несоответствие полученных результатов ожидаемому диапазону концентраций, на основании которого был выбран аналитический диапазон методики. В связи с этим потребовалось скорректировать аналитический диапазон методики, с этой целью была проведена частичная валидация методики по валидационным параметрам линейность, правильность, прецизионность, НПКО, селективность [25].

2.6 Изучение фармакокинетики этмабена

2.6.1 Клиническое исследования этмабена

Исследование фармакокинетики препарата этмабена проводились в рамках фазы I клинического исследования согласно протоколу клинического исследования CRNU-MLA-01-2022 «Открытое нерандомизированное клиническое исследование по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров различных доз препарата Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев». Исследование одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации

(разрешение на проведение клинического исследования № 733 от 28 декабря 2022 г. [110]).

В исследовании были включены здоровые добровольцы мужского пола в возрасте от 18 до 45 лет с индексом массы тела в пределах 18,5–30,0 кг/м², отвечающие остальным критериям включения и не соответствующие ни одному критерию исключения, имеющие верифицированный диагноз «здоров» и давшие письменное согласие на участие в исследовании [110].

Исследование проводилось в два этапа:

- на этапе I оценивались фармакокинетические параметры после однократного препарата этмабена: добровольцы когорты 1 получали по 600 мг этмабена однократно, когорты 2 – по 900 мг однократно, когорты 3 – по 1200 мг однократно;
- на этапе II оценивались фармакокинетические параметры после многократного применения: добровольцы когорты 4 получали суточную дозу 600 мг (по 2 таблетки 300 мг один раз в сутки), когорты 5 – суточную дозу 900 мг (по 2 таблетки 300 мг утром и 1 таблетке 300 мг вечером с интервалом 12 часов), когорты 6 – суточную дозу 1200 мг (по 2 таблетки 300 мг два раза в сутки с интервалом 12 часов) [110]. Прием препарата осуществлялся в течение семи дней, в данном этапе исследования были включены добровольцы, не включенные в первый этап [110].

В клиническом центре на первом этапе исследования проводили отбор цельной крови за 5–10 минут до приема исследуемого препарата отбиралась исходная (0 ч), через 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 72 ч после приема исследуемого препарата [110].

На втором этапе исследования при многократном приеме препарата отбор проб осуществлялся в 1, 3, 5 и 7 день приема. Отбор цельной крови для изучения фармакокинетики этмабена при многократном применении осуществлялся в следующие временные точки:

- день 1: до приема препарата (0 ч) и через 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч после первого приема исследуемого препарата;

- день 3, день 5: до приема препарата (0 ч) и через 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 12 ч, 24 ч после последнего приема исследуемого препарата;
- день 7: до приема препарата (0 ч) и через 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 72 ч после приема исследуемого препарата [110].

В клиническом центре образцы цельной крови, отобранные в пробирки с антикоагулянтом К₃ЭДТА, центрифугировались при 3000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4°C для получения плазмы для анализа.

2.6.2 Статистический этап исследования этмабена

Индивидуальные профили изменения значений концентраций этмабена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после однократного приема препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества ($C_{\max}$) и временем ее достижения ($t_{\max}$), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ($AUC_{(0-t)}$), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) [110, 127]. Дополнительно определяли следующие фармакокинетические параметры: $t_{1/2}$ – период полувыведения лекарственного вещества, k_{el} – константа скорости терминальной элиминации лекарственного вещества, MRT (Mean Residence Time) – среднее время удерживания лекарственного вещества в плазме, V_d – объем распределения, Cl – клиренс [110, 127].

Индивидуальные профили изменения значений концентраций этмабена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после приема препарата Этмабен при многократном приеме лекарственного препарата (день 1, день 7), характеризовались $C_{\max}$, $t_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$. Дополнительно определялись параметры $t_{1/2}$, k_{el} , MRT [110, 127].

Индивидуальные профили изменения значений концентраций этмабена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после приема препарата Этмабен при многократном приеме лекарственного препарата (день 3, день 5), характеризовались $C_{\max}$ и $t_{\max}$, а также площадью под кривой «концентрация – время» в интервале дозирования ($AUC_{(0-\tau)}$) [110, 127].

Для каждого из вышеперечисленных показателей были рассчитаны значения описательной статистики, включающей среднее арифметическое значение, среднее геометрическое значение, стандартное отклонение для среднего, медиану, максимальные и минимальные значения [110, 127].

По аналогии с исследованием малобена, для этмабена также была проведена дополнительная оценка пропорциональности основных ФК параметров ($C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$) и дозы с использованием степенной модели [93, 128, 129]:

$$Y = \alpha \times \text{Dose}^{\beta},$$

где Y – ФК параметр, α – константа, β – коэффициент дозовой пропорциональности [93, 128, 129].

После логарифмического преобразования модель приводилась к линейному виду:

$$\ln(Y) = \ln(\alpha) + \beta \times \ln(\text{Dose}) + \varepsilon,$$

где ε – случайная ошибка [93, 128, 129].

Параметр β интерпретировался как показатель дозовой пропорциональности: значение $\beta=1$ соответствует линейной зависимости между дозой этмабена и ФК параметром ($C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$) [93, 128, 129].

Дозовая пропорциональность этмабена считалась подтвержденной, если 90% доверительный интервал (ДИ) для коэффициента дозовой пропорциональности лежал в пределах критической области, рассчитанной как:

$$\left[1 + \frac{\ln(Q_L)}{\ln(R)}; 1 + \frac{\ln(Q_U)}{\ln(R)}\right],$$

где R – отношение наибольшей и наименьшей изучаемых доз ($R=2$); Q_L – нижняя граница ($Q_L = 0,5$); Q_U – верхняя граница ($Q_U = 2,0$) [93, 128, 129].

2.6.3 Оборудование и программное обеспечение

Расчет фармакокинетических параметров проводили с помощью пакета Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США), статистическая обработка результатов и построение графиков была произведена с помощью программного обеспечения «The R Project for Statistical Computing», версия 4.5.2.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2

1. В ходе исследования разработаны ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения малобена и этмабена в плазме крови. Использовались активные фармацевтические субстанции малобена и этмабена и стандартный образец прометазина, а также интактные образцы, холостые образцы, модельные образцы (калибровочные образцы, образцы контроля качества, образцы без влияния биологической матрицы, образцы без учета влияния степени извлечения из биологической матрицы) и биологические образцы плазмы крови здоровых добровольцев, включенные в клинических исследованиях малобена по протоколу CRHU-4DN-01-2022 и этмабена по протоколу CRHU-MLA-01-2022.

2. Пробоподготовка биологических образцов к анализу осуществлялась с помощью осаждения белков в соотношении матрица/осадитель 1:2. Количественное определение веществ проводилось на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR с масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Хроматографическое разделение проводилось в обращенно-фазовом варианте, детектирование выполнялось с использованием тандемной масс-спектрометрии в режиме мониторинга множественных реакций.

3. Валидация методик определения малобена и этмабена в плазме крови человека проводилась согласно Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС (утверждены решением №85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.), а

также с учетом рекомендаций Европейского агентства лекарственных средств (EMA) и Агентства по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA).

4. Разработанные и валидированные ВЭЖХ-МС/МС-методики определения малобена и этмабена в плазме крови человека использовались для определения концентраций исследуемых веществ в плазме крови человека в фармакокинетических исследованиях малобена и этмабена в рамках клинических исследований фазы I по протоколам CPNU-4DN-01-2022 и CPNU-MLA-01-2022, одобренным Министерством здравоохранения Российской Федерации.

5. Обработка экспериментальных результатов осуществлялась методами математической статистики (метод наименьших квадратов, расчет относительной погрешности и относительного стандартного отклонения). Расчет фармакокинетических параметров проводился с использованием методов описательной статистики, дополнительно проводилась оценка пропорциональности фармакокинетических параметров и дозы с использованием степенной модели.

6. Обработка полученных результатов проводилась с использованием программного обеспечения LabSolutions, Microsoft Excel, The R Project for Statistical Computing.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка ВЭЖХ-МС/МС-методик количественного определения

Разработка ВЭЖХ-МС/МС-методик состояла из последовательных шагов: разработки масс-спектрометрических параметров и разработки хроматографических параметров, включая подбор ВС, выбор способа пробоподготовки проб к анализу, а также определения необходимого аналитического диапазона методики [25, 121, 130-132]. В связи со схожей структурой и физико-химическими свойствами ПМК малобена и этмабена разработка методики определения малобена и методики этмабена были взаимосвязаны [25, 121, 130-132].

При выборе ВС в биоаналитических методиках используются дейтерированные ВС или структурные аналоги, однако исследователи не ограничиваются данным подходом [133-136]. В случае недоступности дейтерированных аналогов аналита или невозможности подобрать похожее по структуре и физико-химическим свойствам вещество, также возможно использовать вещества, схожие по извлечению из матрицы, хорошо изученные в других исследованиях [137-142]. В методике определения малобена и в методике определения этмабена в качестве ВС был выбран прометазин, который в настоящее время не имеет широкого применения в медицинской практике, не является метаболитом малобена и этмабена, а также хорошо изучен в рамках предыдущих исследований, что позволяет учитывать его поведение при анализе и оптимизировать процесс исследования [137-142]. Использование этмабена в качестве ВС в исследовании малобена и малобена в качестве ВС в исследовании этмабена оказалось невозможным, так как оба вещества – малобен и этмабен – являются производными одного соединения и имеют общие пути синтеза. Из-за чего примеси малобена в образцах этмабена, а также примеси этмабена в образцах малобена препятствовали количественному определению и построению калибровочных кривых [25, 111, 114-119].

Разработка масс-спектрометрических параметров начиналась с выбора источника ионизации. Была выбрана ионизация электроспреем, поскольку данный способ ионизации обеспечивает эффективную и мягкую ионизацию и подходит для широкого спектра соединений в сравнении с другими способами ионизации, включая химическую ионизацию при атмосферном давлении. Источник ионизации работал при следующих параметрах: расход осушающего и распыляющего газа составил 20 л/мин и 3 л/мин соответственно, температура блока нагрева и линии десольватации составляла 400 °С и 200-250 °С соответственно. В методике определения малобена была установлена температура линии десольватации на уровне 250 °С, в методике этмабена – на уровне 200 °С.

Детектирование ионов прекурсоров осуществлялось на первом квадруполе (Q1) масс-спектрометра. Сканирование молекул проводилось в положительном и отрицательном режимах на Q1. Малобен и этмабен эффективнее ионизировались в отрицательном режиме, т.к. за счет кислотных свойств молекулы данных соединений легче депротонировались. Поскольку аналитическое оборудование позволяет осуществлять ионизацию одновременно в разных режимах полярности, для ионизации ВС был выбран положительный режим. Для ВС прометазина наибольшая интенсивность сигналов была зафиксирована при положительном режиме ионизации, что связано с облегчением процесса протонирования за счет третичного атома азота в структуре данного соединения. На Q1 были зафиксированы масс-спектры ионов-прекурсоров, представленные на рисунках 7–9, на основании которых были выбраны значения однозарядных ионов-прекурсоров: для малобена – 341 m/z, для этмабена – 250 m/z, для прометазина – 285 m/z.

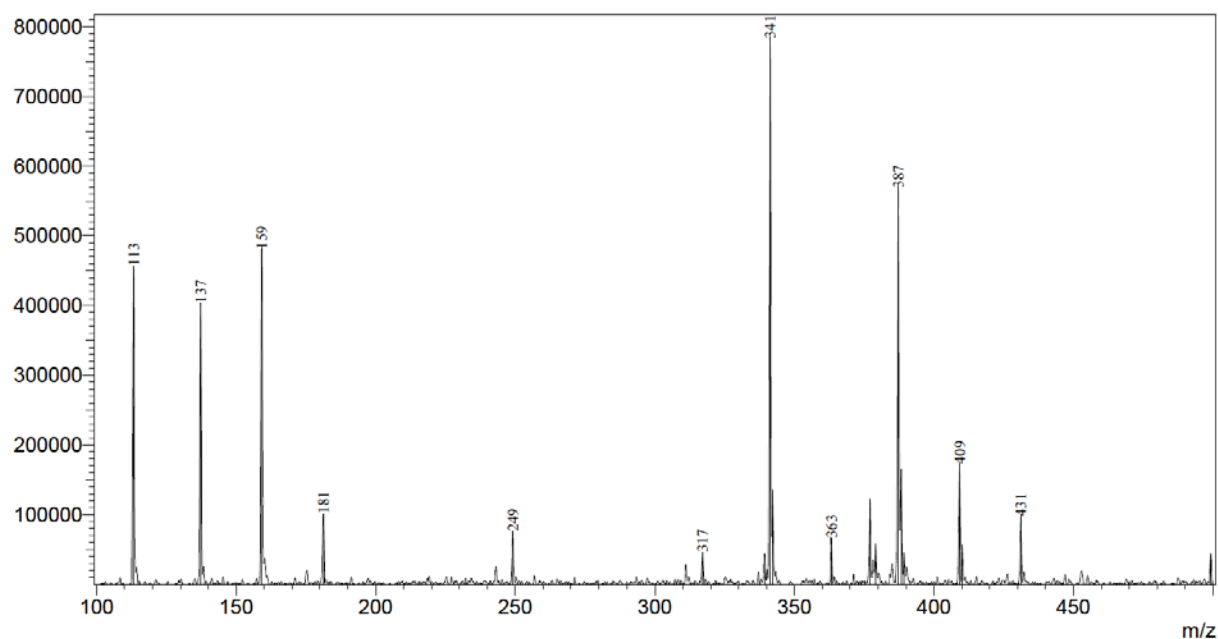


Рисунок 7 – Масс-спектр малобена (раствор малобена в метаноле, $C = 200,000$ мкг/мл), полученный на первом квадруполе (отрицательный режим)

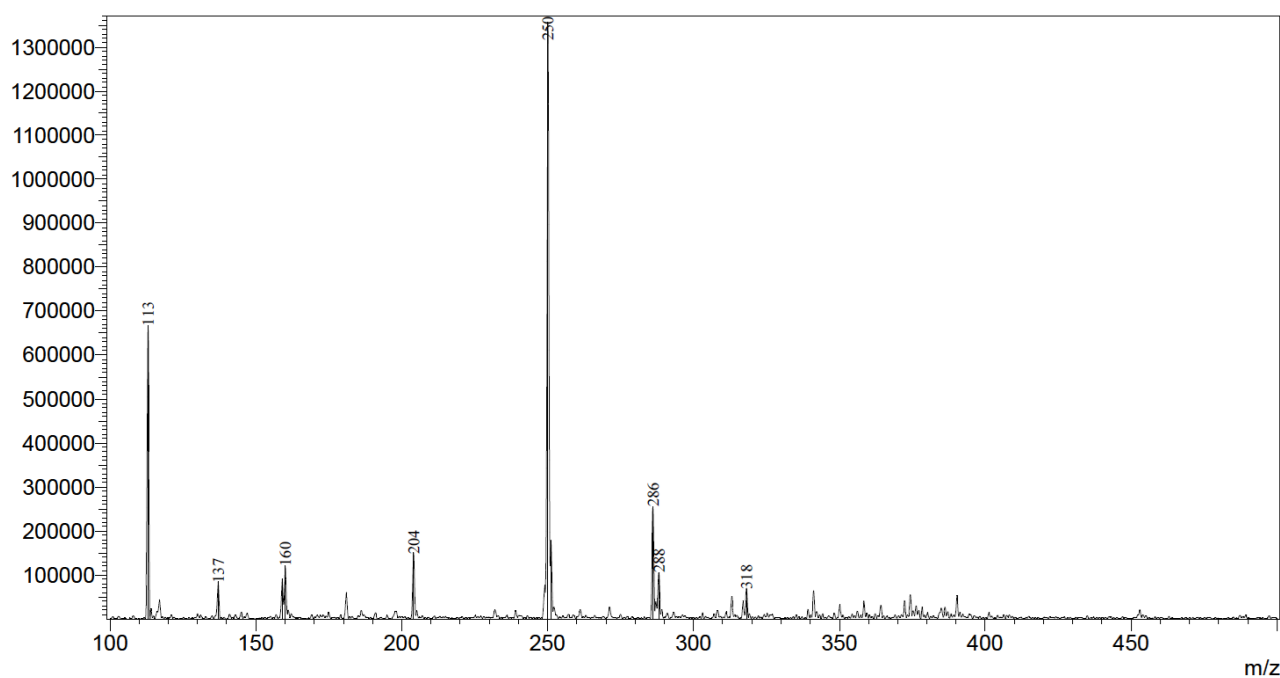


Рисунок 8 – Масс-спектр этмабена (раствор этмабена в метаноле, $C = 200,000$ мкг/мл), полученный на первом квадруполе (отрицательный режим)

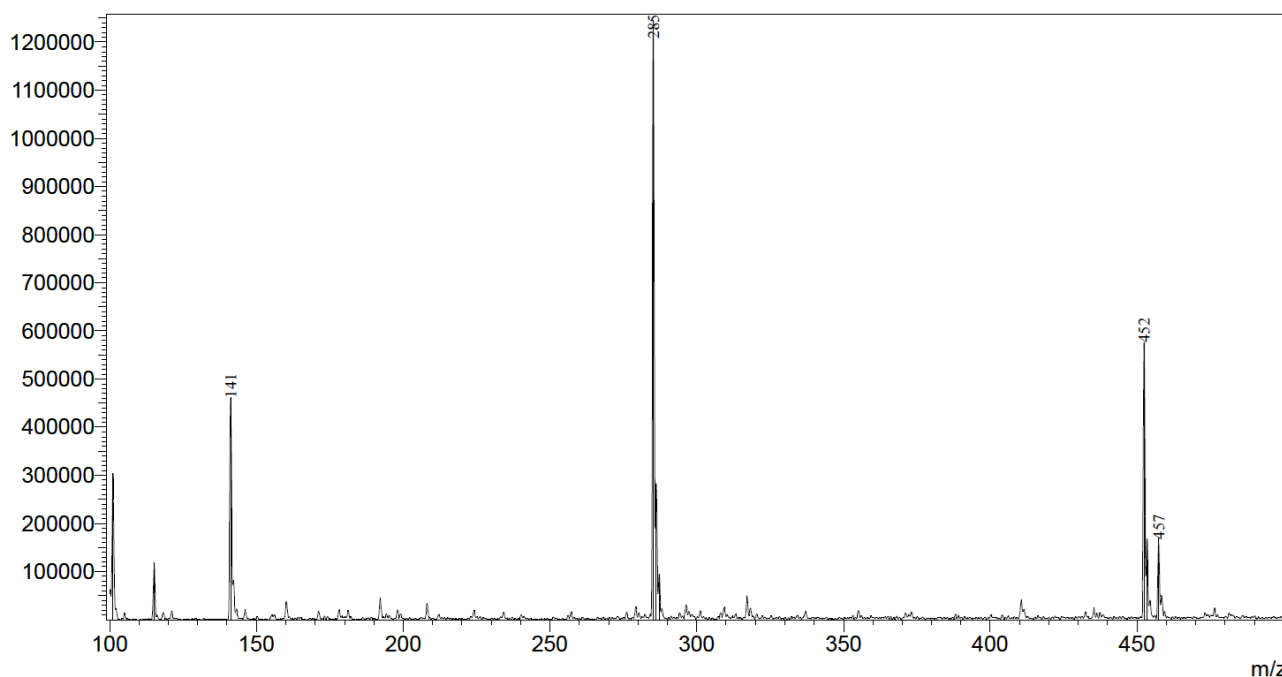


Рисунок 9 – Масс-спектр прометазина (раствор прометазина в метаноле, $C = 200,000$ мкг/мл), полученный на первом квадруполе (положительный режим)

После выбора значений ионов-прекурсоров на Q1 проводилась фрагментация и детектирование ионов-продуктов на третьем квадруполе (Q3) масс-спектрометрического детектора. Полученные масс-спектры ионов-продуктов представлены на рисунках 10–12.

Выбор значений ионов-продуктов на Q3 осуществлялся на основании значений, зафиксированных при различных энергиях соударения. Использовали наиболее интенсивные и воспроизводимые ионы-продукты: для малобена – 136 m/z, 118 m/z и 162 m/z; для этмабена – 92 m/z и 160 m/z; для прометазина – 198 m/z.

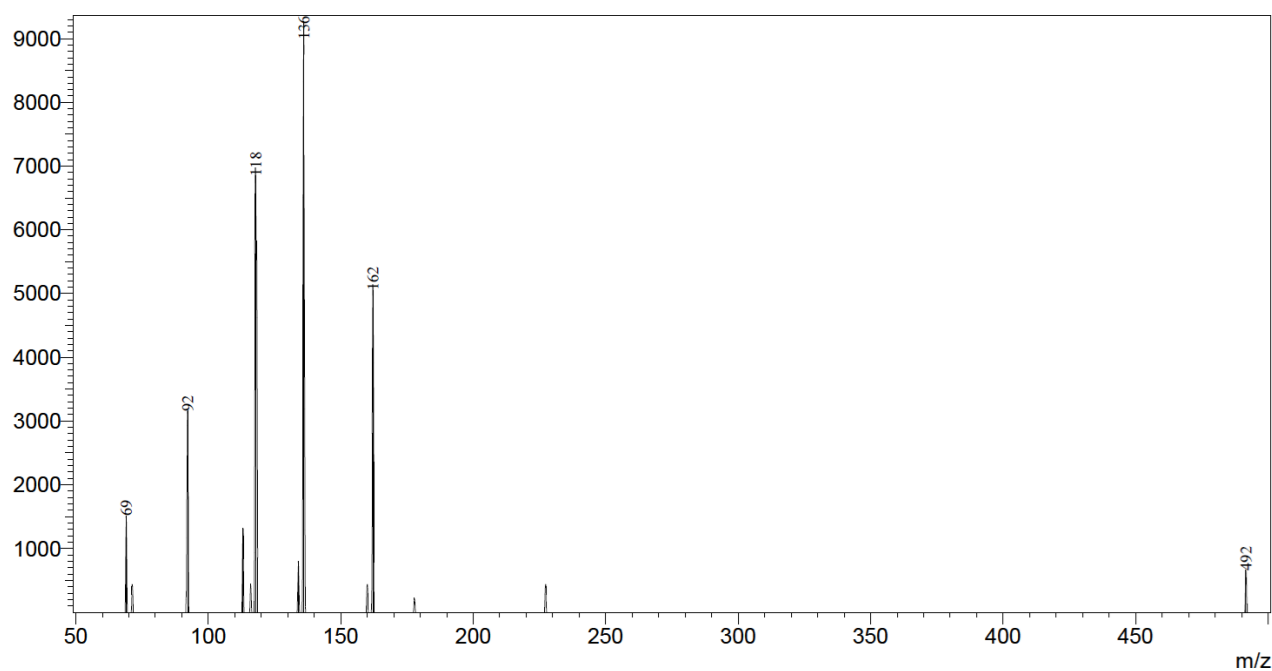


Рисунок 10 – Масс-спектр малобена (раствор малобена в метаноле, $C = 200,000$ мкг/мл), полученный на третьем квадруполе (отрицательный режим)

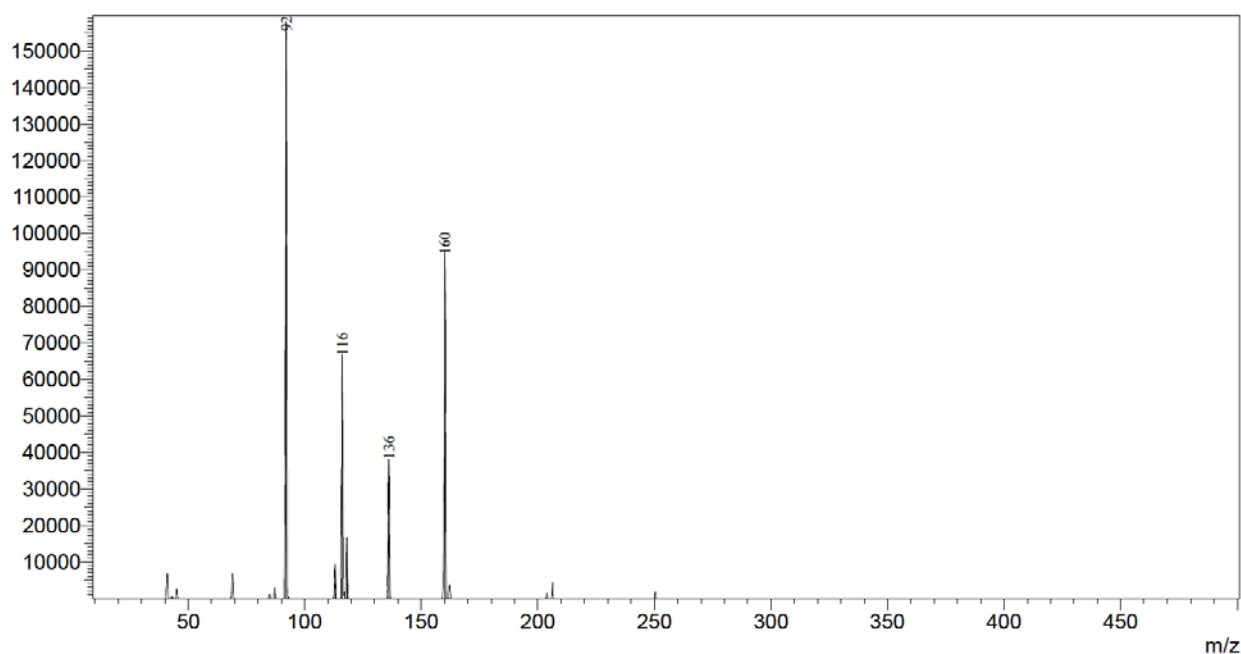


Рисунок 11 – Масс-спектр этмабена (раствор этмабена в метаноле, $C = 200,000$ мкг/мл), полученный на третьем квадруполе (отрицательный режим)

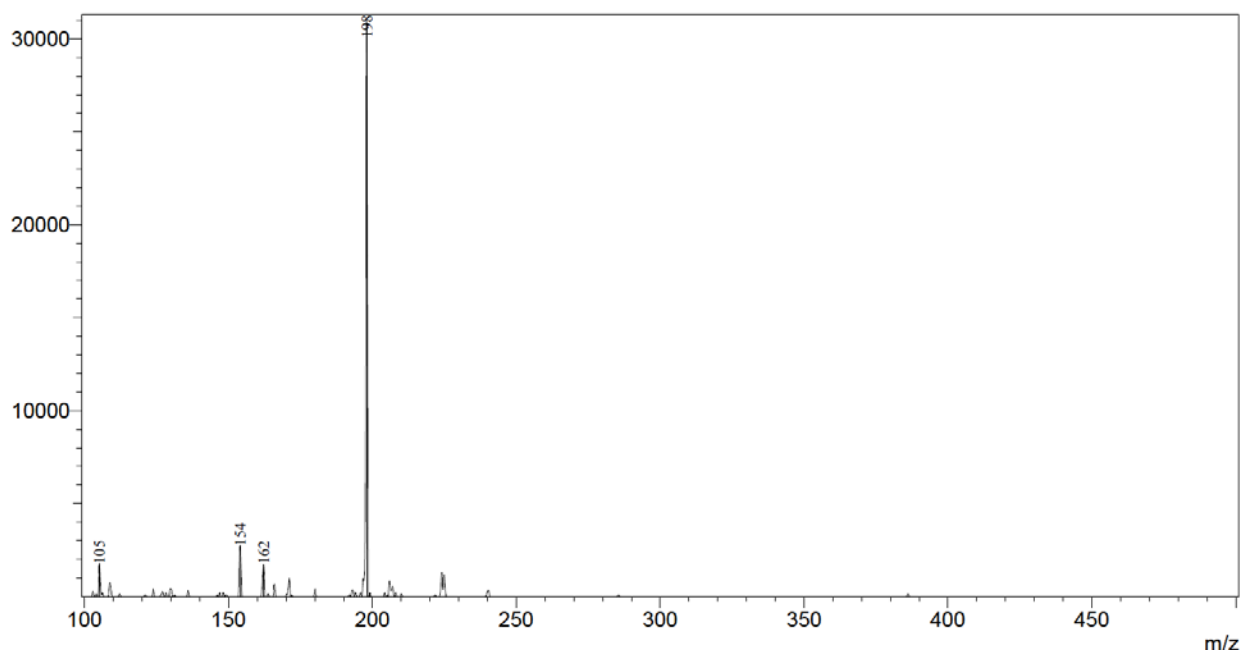
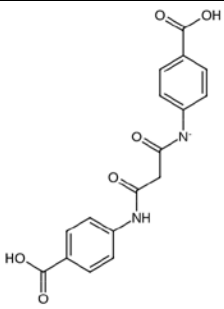
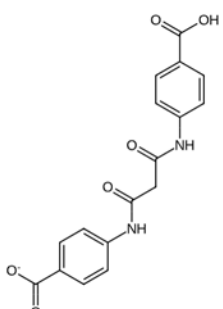
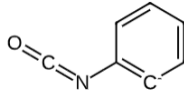
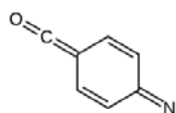
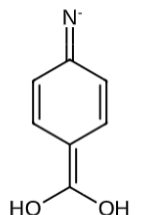
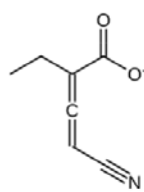


Рисунок 12 – Масс-спектр прометазина (раствор прометазина в метаноле, $C = 200,000$ мкг/мл), полученный на третьем квадруполе (положительный режим)

Предполагаемые пути фрагментации малобена и этмабена, установленные с помощью веб-сервера «CFM-ID 4.0», представлены в таблице 9 и таблице 10 соответственно.

Таблица 9 – Предполагаемые пути фрагментации малобена (ион-прекурсор и ионы-продукты)

Тип иона	Возможная структура		Масса, m/z
Ион-прекурсор			341
Ион-продукт			118
Ион-продукт			136

Продолжение Таблицы 9

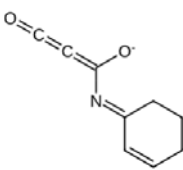
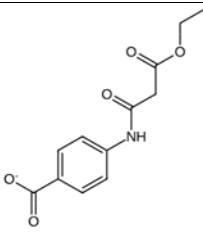
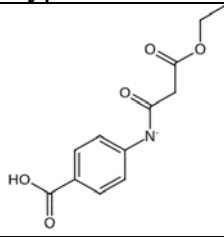
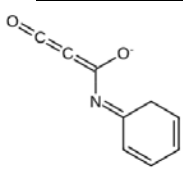
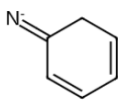
Ион-продукт		162
-------------	---	-----

Таблица 10 – Предполагаемые пути фрагментации этмабена (ион-прекурсор и ионы-продукты)

Тип иона	Возможная структура		Масса, m/z
Ион-прекурсор			250
Ион-продукт			160
Ион-продукт			92

Далее на основе значений прекурсор-ионов и продукт-ионов были выбраны MRM-переходы. Для увеличения интенсивности сигналов подбирались напряжения на капилляре электроспрея, а также в оптической системе масс-спектрометрического детектора. После этого проводилась автоматическая оптимизация значений ионов-прекурсоров и продукт-ионов, напряжений в оптической системе и энергии соударения для повышения интенсивности сигналов. Были получены следующие MRM-переходы:

- В методике количественного определения малобена:
 - 341,15 m/z → 118,05 m/z, 341,15 m/z → 136,10 m/z, 341,15 m/z → 162,20 m/z (малобен);
 - 285,15 m/z → 198,05 m/z (прометазин).
- В методике количественного определения этмабена:
 - 249,90 m/z → 92,15 m/z, 249,90 m/z → 160,20 m/z (этмабен);
 - 284,95 m/z → 197,95 m/z (прометазин).

Хроматографическое разделение проводилось с использованием аналитической колонки Phenomenex Luna C18(2) со следующими характеристиками: длина 50 мм, внутренний диаметр 2 мм, размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор сорбента 100 Å. Анализируемые вещества и ВС хорошо удерживались на данной колонке. Время удерживания малобена и прометазина в методике количественного определения малобена составили около 1,4 мин, а этмабена и прометазина в методике количественного определения этмабена – около 1,2 мин при мертвом времени колонки около 0,5 мин. Была достигнута хорошая симметрия пиков ($\text{tailing factor} \leq 1,2$), а также разделение анализируемых веществ от эндогенных компонентов матрицы, ширина пиков на половине высоты не превышала 0,05.

В качестве подвижной фазы была выбрана комбинация из 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде и 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Между метанолом и ацетонитрилом в качестве компонента элюента В был выбран ацетонитрил, поскольку данный органический растворитель обладает высокой элюирующей способностью и обеспечивает быструю десольватацию и не повышает давление в системе, в отличие от метанола. Добавление муравьиной кислоты в элюенты улучшило ионизацию веществ, форму хроматографических пиков и интенсивность сигналов.

С целью сокращения времени анализ, улучшения формы пиков и разделения от компонентов матрицы тестировались различные градиенты элюирования. Был выбран распространенный в биоаналитических исследованиях тип градиента: начало с небольшого процента элюента В (10% элюента В), линейный подъем до 100% элюента В, плато на 100% элюента В для дополнительной очистки колонки от компонентов матрицы в процессе анализа и повышения стабильности хроматографической системы в процессе анализа, дальнейшее снижение до стартового процента (10% элюента В) и время на уравнивание хроматографической системы. Градиенты в методике малобена и в методике этмабена имеют небольшие различия во времени подъема на 100% и представлены на рисунке 13.

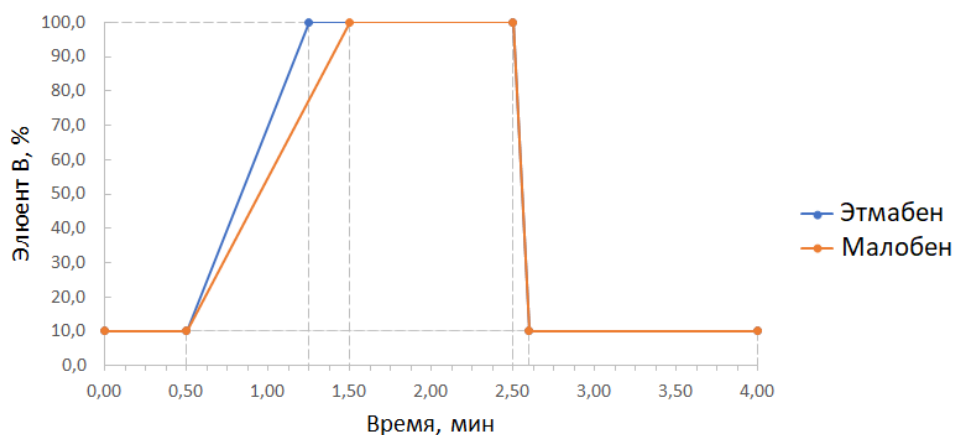


Рисунок 13 – Параметры градиентного элюирования, использованные в методиках определения малобена и этмабена

В качестве способа пробоподготовки был выбран наименее трудоемкий и наиболее быстрый способ пробоподготовки – осаждение белков органическими растворителями, широко используемый в биоаналитических исследованиях, что позволило провести анализ большого количества биообразцов и использовать небольшой объем плазмы крови человека для пробоподготовки [137-145]. В качестве растворителя для пробоподготовки был выбран ацетонитрил, который подходит для умеренно липофильных веществ. Не использовалась пробоподготовка с помощью осаждения метанолом, поскольку данный способ имеет ряд ограничений, включая необходимость проведения дополнительного этапа пробоподготовки – вымораживания липидов. Использование ацетонитрила в качестве компонента элюента В и растворителя для проведения осаждения было необходимо для минимизации эффектов, вызванных несовпадением растворителей.

Особенности разработки биоаналитических методик для количественного определения препаратов с неизученной фармакокинетикой у человека, как у малобена и этмабена, связаны с отсутствием информации о значениях C_{max} , необходимых для выбора аналитического диапазона. Для выбора диапазона применялся «оценочный» подход, который заключается в предварительном приготовлении растворов, соответствующих широкому диапазону, приготовлении с использованием данных растворов модельных образцов, а также проведению

предварительного анализа данных образцов вместе с частью образцов от добровольцев, участвующих в исследованиях малобена и этмабена по протоколам № СРНУ-4DN-01-2022 и СРНУ-MLA-01-2022 соответственно.

В рамках «оценочного» подхода с целью выбора аналитического диапазона малобена были проанализированы образцы от нескольких добровольцев, принимающих минимальную изучаемую и максимальную изучаемую дозировку препарата «Малобен» (60 и 180 мг соответственно) при однократном и многократном режимах дозирования. Анализ образцов с целью определения ожидаемых значений $C_{\max}$ малобена проводился в рамках «оценочного» диапазона: 1,00–1000,00 нг/мл. По результатам предварительного анализа «оценочный» диапазон был скорректирован. Выбранный аналитический диапазон для проведения полной валидации методики количественного определения малобена в плазме крови составил 0,75–150,00 нг/мл [121].

В исследовании этмабена был использован аналогичный подход. Сначала были проанализированы образцы от нескольких добровольцев, принимающих минимальную изучаемую и максимальную изучаемую дозировку препарата «Этмабен» (600 мг и 1800 мг соответственно) при однократном и многократном режимах дозирования. «Оценочный» диапазон составил 5,00–1500,00 нг/мл. По результатам предварительного анализа было установлено, что ожидаемые $C_{\max}$ этмабена в плазме значительно выше, в связи с чем «оценочный» диапазон был скорректирован и составил 0,250–30,000 мкг/мл, после чего была проведена полная валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови в рамках данного аналитического диапазона. Однако в процессе проведения аналитического исследования этмабена была определена необходимость провести доработку методики и расширить аналитический диапазон: снизить значение нижнего предела количественного определения (НПКО) методики до 0,040 мкг/мл и повысить ВПКО методики до 35,000 мкг/мл [25].

3.2 Валидация биоаналитических методик

3.2.1 Валидация методики количественного определения малобена в плазме крови человека

3.2.1.1 Оценка селективности

С целью подтверждения способности методики дифференцировать малобен и прометазин от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образцов плазмы крови анализировали сигналы малобена и прометазина, полученные при анализе холостых образцов, приготовленных на интактной плазме крови, хилезной интактной плазме крови и гемолизной интактной плазме крови (по шесть образцов каждого вида), а также модельных образцов, соответствующих уровню LLOQ, приготовленных на интактной плазме крови, хилезной интактной плазме крови и гемолизной интактной плазме крови (по пять образцов каждого вида) [121].

С целью подтверждения селективности методики при определении малобена рассчитывались значения площадей пиков малобена на холостых образцах к среднему значению площади малобена на образцах LLOQ, соответствующих каждому виду матрицы. Для подтверждения селективности определения прометазина также были рассчитаны отношения сигналов прометазина к среднему значению прометазина, полученных при анализе образцов уровня LLOQ на различных видах матрицы. Результаты считались удовлетворительными при получении отношения площадей пиков не более 20% для малобена и не более 5% для прометазина [121-124].

В таблице 11 представлены полученные значения площадей пиков малобена и прометазина, а также рассчитанные значения отношений площадей пиков. Максимальное рассчитанное значение отношений площадей пиков малобена в холостых образцах к среднему значению площади пиков малобена в образцах LLOQ составили 18,97% в холостых образцах интактной плазмы крови, 16,28% для в холостых образцах интактной гемолизной плазмы крови и 14,24% в холостых образцах интактной хилезной плазмы крови. Максимальное рассчитанное значение

отношений площадей пиков прометазина в холостых образцах к среднему значению площади пиков прометазина в образцах LLOQ составили 0,05% в холостых образцах интактной плазмы крови и в холостых образцах интактной гемолизной плазмы крови, 0,09% в холостых образцах интактной хилезной плазмы крови. Полученные результаты соответствует критериям приемлемости и подтверждает селективность методики [121-124]. Результаты оценки селективности представлены в таблице 8.

Таблица 11 – Результаты оценки селективности методики определения малобена и прометазина

Вещество	Значение площади пика		Отношение площадей в холостом образце к среднему значению в образцах LLOQ, %	
	Малобен	Прометазин	Малобен	Прометазин
Матрица Образец	Интактная плазма крови			
LLOQ	274	128656	–	–
	285	128573		
	289	131605		
	285	129596		
	264	132976		
Холостые образцы	50	0	17,90	0,00
	27	45	9,66	0,03
	44	0	15,75	0,00
	33	60	11,81	0,05
	53	61	18,97	0,05
	22	22	7,87	0,02
Матрица Образец	Интактная гемолизная плазма крови			
LLOQ	304	126190	–	–
	269	132244		
	209	137256		
	288	124267		
	251	120680		
Холостые образцы	43	44	16,28	0,03
	35	0	13,25	0,00

Продолжение Таблицы 11

	17	70	6,43	0,05
	0	30	0,00	0,02
	37	37	14,00	0,03
	39	61	14,76	0,05
Матрица Образец	Интактная хилезная плазма крови			
LLOQ	321	127222	–	–
	299	124140		
	293	122525		
	214	129536		
	242	128738		
Холостые образцы	24	7	8,77	0,01
	10	15	3,65	0,01
	7	45	2,56	0,04
	3	100	1,10	0,08
	39	115	14,24	0,09
	35	44	12,78	0,03

3.2.1.2 Оценка пригодности стандартного образца

Проводили анализ нулевого калибровочного образца, приготовленного без добавления рабочего раствора малобена, калибровочного образца № 10, приготовленного без добавления прометазина, также учитывали результаты, полученные при анализе пяти образцов LLOQ, для оценки отсутствия влияния примесей используемых стандартных образцов и АФС на селективность методики. Отношение площади пика малобена в нулевом калибровочном образце от среднего значения площади пиков малобена на образцах LLOQ не должно превышать 20%. Фактический результат составил 3,94%, что соответствует установленным требованиям. Отношение площади пика прометазина в калибровочном образце № 10 без добавления прометазина от среднего значения площади пиков прометазина на образцах LLOQ не должен превышать 5%. Фактический результат составил 0,02%, что соответствует установленным требованиям [121-124]. Результаты оценки пригодности СО представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Оценка пригодности СО

Код пробы	Значение площади		Отношение площадей, %	
	Малобен	Прометазин	Малобен	Прометазин
Среднее значение на уровне LLOQ	279	130281	–	–
Нулевой калибровочный образец	11	122974	3,94	–
Калибровочный образец № 10 без ВС	52469	21	–	0,02

3.2.1.3 Оценка матричного эффекта

В ходе оценки матричного эффекта проводили анализ образцов, соответствующих уровням L и H без влияния матрицы, т.е. приготовленных с добавлением воды вместо интактной плазмы, а также образцов уровней L и H без влияния степени извлечения, приготовленных на интактной плазме крови, интактной гемолизной плазме крови, интактной хилезной плазме крови (по 6 образцов каждого уровня). Полученные площади пиков малобена и прометазина в образцах без влияния матрицы, а также в образцах без влияния степени извлечения, отражены в таблице 13. На основании данных площадей был рассчитан матричный фактор (M_f) для малобена и прометазина как отношение значения площади пика на хроматограмме образца, приготовленного на плазме крови без степени извлечения к значению площади пика на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы. Был проведен расчет нормализованного по прометазину M_f по отношению полученного значения M_f малобена к M_f прометазина для оценки матричного эффекта, результаты представлены в таблице 13 [121]. Для рассчитанных нормализованных по прометазину значений M_f рассчитывалось относительное стандартное отклонение (RSD) для уровней L и H, результаты представлены в таблице 13. Значение RSD для каждого уровня должно укладываться в 15% [121-124]. Фактические результаты рассчитанных RSD составил 9,74% для уровня L и 10,32% для уровня H, что соответствует требованиям [121-124].

Таблица 13 – Результаты оценки матричного эффекта в методике определения малобена

Уровень	Образцы, приготовленные без влияния матрицы на воде		Вид матрицы	Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения		Значение рассчитанного матричного фактора		Значение нормализованного по ВС матричного фактора
	Значение площади пика			Значение площади пика				
	Малобен	Прометазин		Малобен	Прометазин	Малобен	Прометазин	
L	748	110598	Интактная плазма крови	699	102819	0,93	0,93	1,01
	731	104428		766	115331	1,05	1,10	0,95
	707	103576		720	117088	1,02	1,13	0,90
	674	103279		894	118032	1,33	1,14	1,16
	654	92838		789	117113	1,21	1,26	0,96
	651	99629		771	114700	1,18	1,15	1,03
L	748	110598	Интактная гемолизная плазма	740	106040	0,99	0,96	1,03
	731	104428		719	113952	0,98	1,09	0,90
	707	103576		657	111707	0,93	1,08	0,86
	674	103279		795	112131	1,18	1,09	1,09
	654	92838		715	111128	1,09	1,20	0,91
	651	99629		668	111562	1,03	1,12	0,92
L	748	110598	Интактная хилезная плазма крови	765	111722	1,02	1,01	1,01
	731	104428		763	108709	1,04	1,04	1,00
	707	103576		652	120283	0,92	1,16	0,79
	674	103279		617	107936	0,92	1,05	0,88
	654	92838		727	109584	1,11	1,18	0,94
	651	99629		813	111307	1,25	1,12	1,12
RSD, %								9,74
H	27135	77611	Интактная плазма крови	44968	116532	1,66	1,50	1,10
	28208	82251		39699	122097	1,41	1,48	0,95
	26340	79287		44910	117722	1,71	1,48	1,15

Продолжение Таблицы 13

Н	27643	82257	Интактная плазма крови	44715	117223	1,62	1,43	1,14
	29348	84543		47185	120242	1,61	1,42	1,13
	27444	83720		44452	117969	1,62	1,41	1,15
Н	27135	77611	Интактная гемолизная плазма	42337	115387	1,56	1,49	1,05
	28208	82251		43841	120815	1,55	1,47	1,06
	26340	79287		31477	116419	1,20	1,47	0,81
	27643	82257		46252	126549	1,67	1,54	1,09
	29348	84543		37352	110889	1,27	1,31	0,97
	27444	83720		35759	114100	1,30	1,36	0,96
Н	27135	77611	Интактная хилезная плазма крови	43256	116437	1,59	1,50	1,06
	28208	82251		36565	116871	1,30	1,42	0,91
	26340	79287		32644	110127	1,24	1,39	0,89
	27643	82257		37507	116206	1,36	1,41	0,96
	29348	84543		32620	107123	1,11	1,27	0,88
	27444	83720		38740	106427	1,41	1,27	1,11
RSD, %								10,32

3.2.1.4 Оценка линейности и нижнего предела количественного определения

Был проведен анализ калибровочных образцов уровней № 1–10 с номинальными концентрациями в диапазоне 0,75–150,00 нг/мл в плазме крови для оценки линейности методики. Для построения калибровочных графиков была выбрана линейная зависимость. Коэффициент корреляции в каждом случае составил не менее 0,99. Уравнения калибровочных кривых вместе с коэффициентами корреляции представлены в таблице 14. Пример калибровочного графика, построенного в координатах отношение площади пика малобена к площади пика малобена от отношения концентрации малобена к концентрации прометазина из валидационного цикла из № 1 приведен на рисунке 14 [121].

Таблица 14 – Параметры калибровочных кривых для малобена

№ валидационного цикла	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции
1	$0,266550 \cdot x + 0,000243354$	0,9958293
2	$0,265883 \cdot x - 0,000234216$	0,9975743
3	$0,392671 \cdot x + 0,000573404$	0,9968040

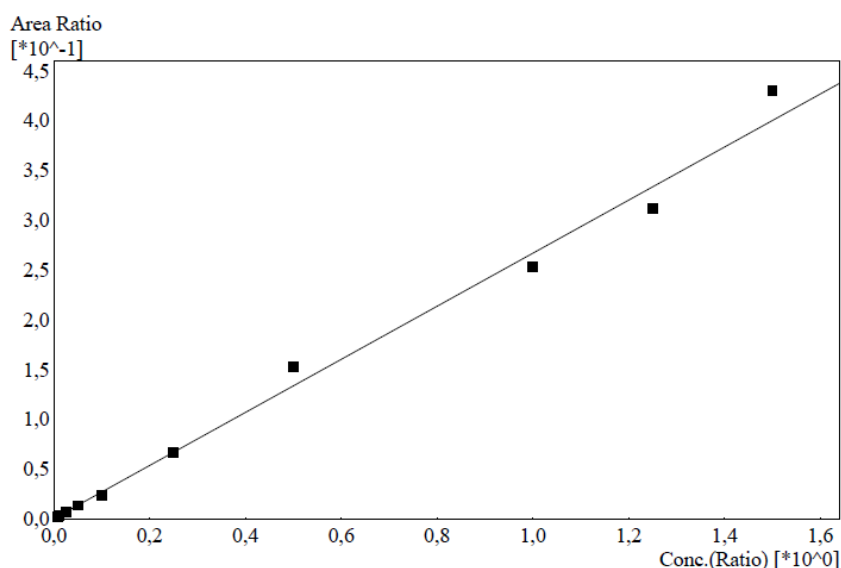


Рисунок 14 – Пример калибровочного графика для малобена из валидационного цикла № 1 в координатах отношение площади пика малобена к площади пика прометазина от отношения концентрации малобена к концентрации прометазина в плазме крови

За значение НПКО методики была принята минимальная концентрацию малобена, поддающаяся надежному определению в плазме человека с рассчитанным значением RSD, не превышающим 20%, и значением относительной погрешности (E), не превышающим $\pm 20\%$ [122-124]. Значение НПКО малобена составило 0,75 нг/мл в плазме крови. На рисунке 15 представлена хроматограмма, полученная при анализе модельного образца на уровне контроля качества LLOQ [121].

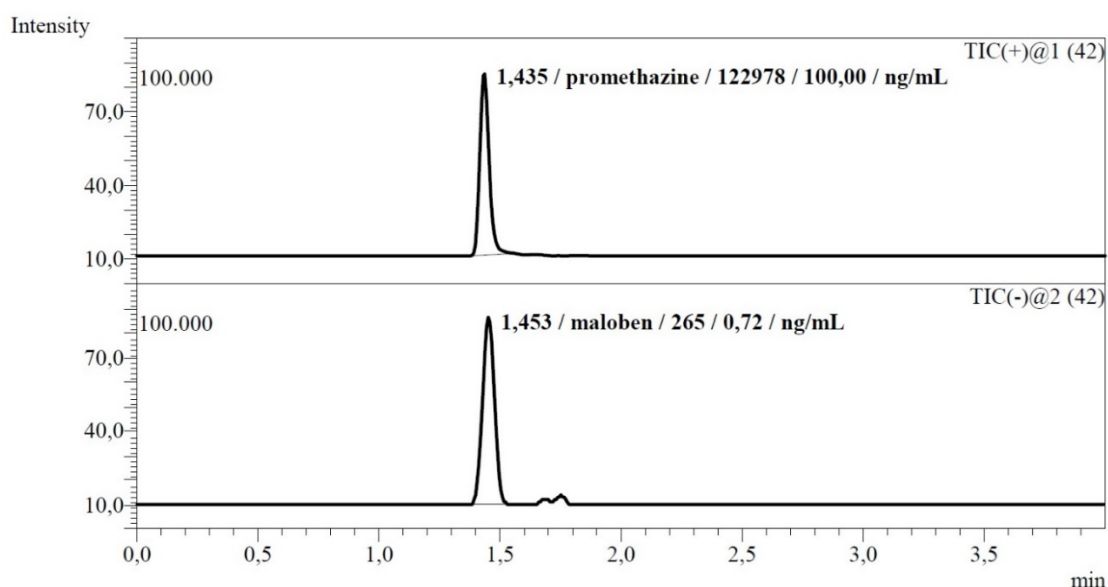


Рисунок 15 – Пример хроматограммы модельного образца плазмы крови, соответствующего контролю качества малобена на уровне LLOQ с номинальной концентрацией 0,75 нг/мл (первый сектор TIC(+)@1 хроматограммы – детекция прометазина; второй сектор TIC(-)@2 хроматограммы – детекция малобена)

3.2.1.5 Оценка правильности и прецизионности

Проводилась оценка правильности и прецизионности внутри и между циклами. Для этого был выполнен последовательный анализ 5 образцов контролей качества уровней LLOQ, L, M1, M2, M3, H в рамках трех валидационных циклов.

На основании полученных данных были рассчитаны значения E и RSD для оценки правильности и прецизионности соответственно. Значения E не превышали $\pm 20\%$ для уровня LLOQ, $\pm 15\%$ – для остальных уровней. Значения RSD не превышали 20% для уровня LLOQ, 15% – для остальных уровней. Значения

концентраций малобена, полученные при анализе модельных образцов для оценки правильности и прецизионности, представлены в таблице 15. Результаты оценки правильности и прецизионности внутри циклов 1–3 и между циклами 1–3 представлены в таблице 16. Рассчитанные значения RSD и E соответствовали критериям приемлемости [121-124].

Таблица 15 – Значения концентраций, полученные при анализе модельных образцов для оценки правильности и прецизионности

Уровень	Концентрация малобена, нг/мл		
	Валидационный цикл № 1	Валидационный цикл № 2	Валидационный цикл № 3
LLOQ	0,71	0,90	0,87
	0,74	0,81	0,86
	0,73	0,77	0,65
	0,73	0,81	0,72
	0,65	0,72	0,88
L	2,56	1,88	2,71
	2,50	2,52	2,35
	2,37	2,33	2,36
	2,47	2,15	1,94
	2,67	2,68	2,31
M1	6,64	7,42	7,46
	6,58	8,85	7,11
	6,31	7,25	7,75
	6,77	8,39	6,35
	6,24	8,54	6,87
M2	25,87	32,66	26,02
	26,17	32,57	26,44
	25,92	31,46	25,16
	26,17	31,72	26,29
	26,21	31,88	26,20
M3	65,87	80,64	68,25
	66,90	82,63	69,13
	61,30	81,20	74,53

Продолжение Таблицы 15

МЗ	64,14	83,00	71,98
	63,83	86,48	70,22
Н	108,15	128,53	106,52
	100,30	123,94	107,25
	99,67	133,27	109,88
	99,40	128,76	105,56
	106,36	124,88	113,96

Таблица 16 – Результаты оценки правильности и прецизионности

Уровень	Значение RSD, %				Значение E, %			
	Внутри цикла (n=5)			Между циклами (n=15)	Внутри цикла (n=5)			Между циклами (n=15)
	Цикл №1	Цикл №2	Цикл №3	Циклы №1-3	Цикл №1	Цикл №2	Цикл №3	Циклы №1-3
LLOQ	5,10	8,24	13,13	10,52	-5,07	6,93	6,13	2,67
L	4,42	13,54	11,70	10,40	11,73	2,76	3,73	6,07
M1	3,46	8,79	7,60	11,55	-13,23	7,87	-5,23	-3,53
M2	0,61	1,66	1,94	10,56	-13,11	6,86	-13,26	-6,50
M3	3,33	2,76	3,53	11,24	-14,12	10,39	-5,57	-3,10
H	4,04	2,89	3,11	10,28	-14,35	6,56	-9,47	-5,75

3.2.1.6 Оценка степени извлечения

Был проведен анализ по 3 образца уровней L, M1, M2, M3, H, приготовленных без влияния степени извлечения на интактной плазме крови, гемолизной интактной плазме крови и хилезной интактной плазме крови, а также по 3 образца уровня L, M1, M2, M3 для оценки степени извлечения (СИ) из различных видов интактной матрицы [121].

Значения площадей, полученные при анализе данных образцов, представлены в таблице 17 вместе с рассчитанными значениями отношений площадей малобена к прометазину (в образцах без влияния степени извлечения и образцах для оценки степени извлечения) и значениями СИ и RSD.

Среднее значение СИ малобена 84,82%, что является достаточным при условии обеспечения воспроизводимого извлечения, что подтверждается рассчитанным значением RSD (12,29%) и соответствует критериям приемлемости [121-124].

Таблица 17 – Результаты оценки степени извлечения в методике определения малобена

Вид матрицы	Уровень	Образцы без влияния степени извлечения			Образцы для оценки степени извлечения			Степень извлечения, %
		Значение площади пика		Отношение площадей пиков малобена/прометазина	Значение площади пика		Отношение площадей пиков малобена/прометазина	
		Малобен	Прометазин		Малобен	Прометазин		
Интактная плазма крови	L	699	102819	0,007	680	120398	0,006	83,08
		766	115331	0,007	699	122215	0,006	86,11
		720	117088	0,006	727	118508	0,006	99,76
	M1	2805	121114	0,023	2450	127996	0,019	82,65
		2473	124873	0,020	2315	121057	0,019	96,56
		3306	127432	0,026	2053	122351	0,017	64,68
	M2	9302	117600	0,079	8468	124173	0,068	86,22
		10069	130031	0,077	8593	125236	0,069	88,61
		10890	124976	0,087	8383	116972	0,072	82,25
	M3	26821	120304	0,223	20836	126824	0,164	73,69
		25011	118767	0,211	21179	123531	0,171	81,41
		29326	116150	0,252	21646	121725	0,178	70,43
	H	44968	116532	0,386	35071	124747	0,281	72,86
		39699	122097	0,325	31543	114723	0,275	84,56
		44910	117722	0,381	31595	119296	0,265	69,42
Интактная гемолизная плазма	L	740	106040	0,007	666	117938	0,006	80,92
		719	113952	0,006	652	114306	0,006	90,40
		657	111707	0,006	622	113401	0,005	93,26
	M1	2041	111295	0,018	2078	113373	0,018	99,95
		2789	121139	0,023	1886	110621	0,017	74,05
		1992	108660	0,018	1994	113852	0,018	95,54
	M2	10135	110878	0,091	9466	109769	0,086	94,34
		10273	116311	0,088	8277	123154	0,067	76,09

Продолжение Таблицы 17

Интактная гемолизная плазма	M2	7335	107315	0,068	8101	117242	0,069	101,09
	M3	22883	113879	0,201	19814	115365	0,172	85,47
		24662	108238	0,228	22243	124332	0,179	78,52
		18973	98809	0,192	21220	114327	0,186	96,66
	H	42337	115387	0,367	35954	121911	0,295	80,38
		43841	120815	0,363	33547	121756	0,276	75,93
		31477	116419	0,270	33884	114030	0,297	109,90
Интактная хилезная плазма крови	L	765	111722	0,007	675	121438	0,006	81,18
		763	108709	0,007	670	115712	0,006	82,50
		652	120283	0,005	648	117392	0,006	101,83
	M1	2224	105774	0,021	2076	117022	0,018	84,37
		2560	106831	0,024	2147	120011	0,018	74,66
		2052	109858	0,019	2489	139033	0,018	95,84
	M2	10318	108463	0,095	8183	119424	0,069	72,03
		10466	110509	0,095	8599	124434	0,069	72,97
		7612	111116	0,069	8165	119218	0,068	99,98
	M3	25767	112881	0,228	20373	116860	0,174	76,37
		24597	111110	0,221	25065	141061	0,178	80,27
		23388	111578	0,210	23528	132212	0,178	84,90
	H	43256	116437	0,371	35887	129762	0,277	74,44
		36565	116871	0,313	33718	123339	0,273	87,38
		32644	110127	0,296	32497	117557	0,276	93,26
Среднее значение степени извлечения, %								84,82
RSD, %								12,29

3.2.1.7 Оценка переноса пробы

При проведении оценки переноса пробы в рамках валидационных циклов № 1–3 проводился анализ холостых образцов после предварительного анализа калибровочного образца № 10 [121].

Отношение площадей малобена, полученных на холостых образцах, к среднему значению площадей малобена, полученных при анализе образцов LLOQ, не должно превышать 20%. Фактический результат составил 5,73%, 17,58% и 19,60% для валидационных циклов 1-3 соответственно, что соответствует требованиям. Отношение значений площадей прометазина, полученных на холостых образцах, к среднему значению площадей прометазина, полученному при анализе образцов LLOQ, не должно превышать 5%. Фактический результат составил 0% для валидационных циклов 1–3, что соответствует установленным требованиям [121-124]. Значения площадей, полученных при оценке переноса пробы, а также рассчитанное отношение площадей представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Оценка переноса пробы

№ цикла	Код пробы	Значение площади пика		Отношение площадей, %	
		Малобен	Прометазин	Малобен	Прометазин
1	LLOQ	274	128656	—	—
		285	128573		
		289	131605		
		285	129596		
		264	132976		
	<i>Среднее значение</i>	279	130281		
	Холостой образец	16	0	5,73	0,00
2	LLOQ	236	109074	—	—
		207	107633		
		204	111893		
		202	105599		
		175	104068		
	<i>Среднее значение</i>	205	107653		
	Холостой образец	36	0	17,58	0,00

Продолжение Таблицы 18

3	LLOQ	356	89658	—	—
		334	84197		
		262	83981		
		294	86824		
		336	83479		
	<i>Среднее значение</i>	316	85628		
	Холостой образец	62	0	19,60	0,00

3.2.1.8 Оценка различных видов стабильности

Были изучены различные виды стабильности:

- настольная стабильность при хранении при комнатной температуре,
- постпрепаративная стабильность при хранении в автосамплере хроматографа в течение 79 часов;
- стабильность модельных образцов спустя три цикла замораживания в течение не менее 36 часов при $-42,5 \pm 7,5$ °C и размораживания в течение не менее 6 часов при 20 ± 5 °C;
- стабильность стандартных растворов в течение 149 дней при $-42,5 \pm 7,5$ °C;
- долгосрочная стабильность модельных образцов, оцененная методом брекетинга при -20 ± 5 °C и при -75 ± 10 °C в течение 149 дней [121].

Для оценки каждого вида стабильности анализировали по 5 модельных образцов на уровнях L и H. Рассчитанные значения E не превышали $\pm 15\%$, что соответствует требованиям [121-124]. Результаты оценки стабильности малобена в образцах на уровнях L и H представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Оценка различных видов стабильности малобена в образцах на уровне L и H

Вид стабильности	Уровень L			Уровень H		
	Концентрация малобена, нг/мл	Среднее значение, нг/мл	Е, %	Концентрация малобена, нг/мл	Среднее значение, нг/мл	Е, %
Настольная	2,88	2,50	10,93	124,53	119,15	-0,71
	2,24			117,00		
	2,81			120,76		
	2,21			115,64		
	2,34			117,84		
Постпрепаративная	1,87	2,14	-4,80	105,14	106,44	-11,30
	1,98			98,85		
	2,00			106,62		
	1,89			117,41		
	2,97			104,20		
При трехкратной заморозке-разморозке	1,51	2,01	-10,84	110,88	107,34	-10,55
	2,43			109,81		
	1,92			102,79		
	2,16			107,11		
	2,01			106,10		
Долгосрочная при -20 °С	1,86	2,03	-9,60	103,84	104,46	-12,95
	1,98			105,26		
	1,89			111,16		
	2,45			102,13		
	1,99			99,93		
Долгосрочная при -80 °С	2,42	2,04	-9,33	106,67	106,74	-11,05
	1,93			99,82		
	2,00			105,85		
	1,97			109,74		
	1,88			111,60		
Стабильность исходных растворов	1,93	2,04	-9,24	102,26	103,34	-13,88
	1,99			106,58		
	2,07			106,83		
	2,24			101,06		
	1,98			99,97		

Продолжение Таблицы 19

Стабильность рабочих растворов	1,95	2,07	-8,18	101,84	104,72	-12,74
	2,00			107,18		
	2,01			103,76		
	2,33			102,13		
	2,04			108,68		

3.2.2 Валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека.

3.2.2.1 Оценка селективности

Были проанализированы по 6 холостых образцов, приготовленных на различных видах матрицы, и по 5 модельных образцов LLOQ, приготовленных на различных видах матрицы, с целью оценки селективности методики. Рассчитывалось отношение площадей этмабена на холостых образцах к среднему значению площади этмабена на образцах LLOQ, соответствующих каждому виду матрицы, а также отношение площадей прометазина к среднему значению прометазина на образцах LLOQ, приготовленных на различных видах матрицы [25].

Оценка селективности в рамках валидации проводилась дважды: при проведении полной валидации методики со значением НПКО 0,250 мкг/мл, а также при проведении частичной валидации методики в связи с расширением аналитического диапазона и снижением значения НПКО до 0,040 мкг/мл. В таблице 20 представлены значения площадей пиков этмабена и прометазина, а также рассчитанные значения отношений площадей при проведении полной валидации, в таблице 21 – при проведении частичной валидации. Максимальные рассчитанные значения укладываются в критерии приемлемости (не более 20% для этмабена и не более 5% для прометазина) [25, 122-124].

Таблица 20 – Результаты оценки селективности методики определения этмабена и прометазина (полная валидация)

	Значение площади пика		Отношение площади в холостом образце к среднему значению в образцах LLOQ, %	
Вещество	Этмабен	Прометазин	Этмабен	Прометазин
Матрица Образец	Интактная плазма крови			
LLOQ (0,250 мкг/мл)	20239	678462	–	–
	19849	674264		
	20788	690783		
	17941	664058		
	17747	673954		
Холостые образцы	1821	5719	9,43	0,85
	1730	3992	8,96	0,59
	1342	2522	6,95	0,37
	1112	2993	5,76	0,44
	956	2744	4,95	0,41
	574	2608	2,97	0,39
Матрица Образец	Интактная гемолизная плазма крови			
LLOQ (0,250 мкг/мл)	17902	679903	–	–
	16564	664852		
	17102	662960		
	16642	658552		
	17976	659933		
Холостые образцы	543	1474	3,15	0,22
	935	2667	5,42	0,40
	517	1808	3,00	0,27
	583	1850	3,38	0,28
	802	2207	4,65	0,33
	830	2110	4,82	0,32

Продолжение Таблицы 20

Матрица Образец	Интактная хилезная плазма крови			
LLOQ (0,250 мкг/мл)	17500	758966	–	–
	19345	761434		
	18075	725707		
	19284	752171		
	19082	705331		
Холостые образцы	711	1827	3,81	0,25
	504	1486	2,70	0,20
	558	1422	2,99	0,19
	603	1710	3,23	0,23
	322	1579	1,73	0,21
	355	2141	1,90	0,29

Таблица 21 – Результаты оценки селективности методики определения этмабена и прометазина (частичная валидация)

	Значение площади пика		Отношение площади в холостом образце к среднему значению в образцах LLOQ, %	
Вещество	Этмабен	Прометазин	Этмабен	Прометазин
Матрица Образец	Интактная плазма крови			
LLOQ (0,040 мкг/мл)	1971	142410	–	–
	1797	141486		
	1661	140037		
	2009	141679		
	1756	143182		
Холостые образцы	310	921	16,86	0,65
	231	1260	12,56	0,89
	278	1135	15,12	0,80
	252	424	13,70	0,30
	318	1151	17,29	0,81
	214	994	11,64	0,70

Продолжение Таблицы 21

Матрица Образец	Интактная гемолизная плазма крови			
LLOQ (0,040 мкг/мл)	1717	145968	–	–
	1774	147143		
	1753	150662		
	1700	147295		
	1854	146498		
Холостые образцы	259	570	14,72	0,39
	290	1038	16,48	0,70
	259	942	14,72	0,64
	233	651	13,24	0,44
	308	683	17,50	0,46
	162	697	9,21	0,47
Матрица Образец	Интактная хилезная плазма крови			
LLOQ (0,040 мкг/мл)	1730	148716	–	–
	1661	141840		
	1939	141756		
	1748	140173		
	1890	150526		
Холостые образцы	312	831	17,40	0,57
	259	562	14,44	0,39
	265	726	14,77	0,50
	135	543	7,53	0,38
	290	447	16,17	0,31
	164	648	9,14	0,45

3.2.2.2 Оценка пригодности стандартного образца

В ходе подтверждения пригодности СО проводился анализ нулевого калибровочного образца, приготовленного без добавления рабочего раствора этмабена, а также калибровочного образца № 9, приготовленного без добавления прометазина, также учитывали результаты, полученные при анализе пяти модельных образцов, соответствующих уровню LLOQ [25].

Отношение площади пика этмабена в нулевом калибровочном образце к среднему значению площади пиков этмабена на образцах LLOQ составило 3,00%, что соответствует требованиям (не более 20%). Отношение площади пика прометазина в калибровочном образце № 9 без добавления прометазина к среднему значению площади пиков прометазина на образцах LLOQ составило 0,74%, что соответствует требованиям (не более 5 %) от среднего значения площади прометазина, полученных при анализе образцов LLOQ [25, 122-124]. Результаты оценки пригодности СО представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Оценка пригодности СО

Код пробы	Значение площади		Отношение площади, %	
	Этмабен	Прометазин	Этмабен	Прометазин
Среднее значение на уровне LLOQ	19313	676304	–	–
Нулевой калибровочный образец	579	671470	3,00	–
Калибровочный образец № 9 без ВС	1927610	5030	–	0,74

3.2.2.3 Оценка матричного эффекта

С целью оценки матричного эффекта анализировали по 6 образцов уровней L и H без влияния матрицы, а также по 6 образцов уровней L и H без влияния степени извлечения, приготовленных на различных видах матрицы. На основании площадей, полученных при анализе образцов, приготовленных на воде без влияния матрицы, а также образцов, приготовленных без влияния степени извлечения на уровнях L и H, рассчитывался M_f для этмабена и прометазина. Для этого вычислялось отношение значения площадей на хроматограмме образца, приготовленного на плазме крови без степени извлечения соответствующего уровня к значению площадей на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы соответствующего уровня. С целью оценки матричного эффекта проводился расчет нормализованного по ВС M_f как

отношение полученного значения M_f этмабена к M_f прометазина для уровней L и H каждого вида матрицы [25].

Для рассчитанных нормализованных по прометазину значений M_f рассчитывалось RSD для каждого из уровня. Значения RSD составило 10,29% для уровня L и 4,63% для уровня H, что укладывается в допустимые значения (не более 15%) [25, 122-124]. В таблице 23 представлены результаты оценки матричного эффекта: значения площадей пиков этмабена и прометазина в образцах, приготовленных без влияния матрицы, и образцов, приготовленных без влияния степени извлечения, приведены значения рассчитанных значений M_f , значения M_f , нормализованного по прометазину, и значения RSD.

Таблица 23 – Результаты оценки матричного эффекта в методике определения этмабена

Уровень	Образцы, приготовленные без влияния матрицы на воде		Вид матрицы	Образцы, приготовленные без влияния степени извлечения		Значение рассчитанного матричного фактора		Значение нормализованного по ВС матричного фактора
	Значение площади пика			Значение площади пика				
	Этмабен	Прометазин		Этмабен	Прометазин	Этмабен	Прометазин	
L	62660	584985	Интактная плазма крови	51635	635510	0,82	1,09	0,76
	60466	651551		53581	636749	0,89	0,98	0,91
	58405	669986		57440	618796	0,98	0,92	1,06
	58249	617840		52593	645047	0,90	1,04	0,86
	56795	653765		45213	648947	0,80	0,99	0,80
	52808	586005		45512	657229	0,86	1,12	0,77
L	62660	584985	Интактная гемолизная плазма	48660	572159	0,78	0,98	0,79
	60466	651551		47707	640275	0,79	0,98	0,80
	58405	669986		57085	633225	0,98	0,95	1,03
	58249	617840		53800	661978	0,92	1,07	0,86
	56795	653765		51262	629060	0,90	0,96	0,94
	52808	586005		49769	629849	0,94	1,07	0,88
L	62660	584985	Интактная хилезная плазма крови	51082	595063	0,82	1,02	0,80
	60466	651551		50628	624951	0,84	0,96	0,87
	58405	669986		53433	597021	0,91	0,89	1,03
	58249	617840		51447	647693	0,88	1,05	0,84
	56795	653765		49029	646850	0,86	0,99	0,87
	52808	586005		50388	638234	0,95	1,09	0,88
RSD, %								10,29
H	1512783	609109	Интактная плазма крови	1309104	601319	0,87	0,99	0,88
	1293369	562301		1321000	638929	1,02	1,14	0,90

Продолжение Таблицы 23

Н	1538398	600526	Интактная плазма крови	1452330	593802	0,94	0,99	0,95
	1431007	607821		1405910	649745	0,98	1,07	0,92
	1430500	610960		1303721	626983	0,91	1,03	0,89
	1466572	601464		1500259	630470	1,02	1,05	0,98
Н	1512783	609109	Интактная гемолизная плазма	1382551	584075	0,91	0,96	0,95
	1293369	562301		1340671	657181	1,04	1,17	0,89
	1538398	600526		1339524	559665	0,87	0,93	0,93
	1431007	607821		1344060	629715	0,94	1,04	0,91
	1430500	610960		1308012	617165	0,91	1,01	0,91
	1466572	601464		1434887	619820	0,98	1,03	0,95
Н	1512783	609109	Интактная хилезная плазма крови	1419986	573216	0,94	0,94	1,00
	1293369	562301		1362821	614167	1,05	1,09	0,96
	1538398	600526		1467585	591405	0,95	0,98	0,97
	1431007	607821		1245968	634611	0,87	1,04	0,83
	1430500	610960		1367656	644490	0,96	1,05	0,91
	1466572	601464		1235127	576733	0,84	0,96	0,88
RSD, %								4,63

3.2.2.4 Оценка линейности и нижнего предела количественного определения

При оценке линейности в рамках первого аналитического диапазона (валидационные циклы № 1, 2, 3 – полная валидация, цикл № 5 – дополнительный цикл с оценкой долгосрочной стабильности) были использованы калибровочные образцы №1–9, соответствующие диапазону 0,250–30,000 мкг/мл. После проведения частичной валидации (валидационный цикл № 4), в связи с необходимостью в расширении аналитического диапазона, использовались калибровочные образцы № 1–10, соответствующие диапазону 0,040–35,000 мкг/мл [25].

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. График калибровочной кривой валидационного цикла № 1 приведен на рисунке 16. Значения переменных и коэффициенты корреляции для калибровочных графиков в валидационных циклах приведены в таблице 24 [25].

Таблица 24 – Параметры калибровочных кривых для этмабена

№ валидационного цикла	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции
1	$0,0886085 \cdot x + 0,00553852$	0,9984071
2	$0,0692212 \cdot x + 0,00448326$	0,9976684
3	$0,0972955 \cdot x + 0,00409318$	0,9965155
4	$0,237731 \cdot x + 0,00353553$	0,9972250
5	$0,433870 \cdot x + 0,0259548$	0,9980059

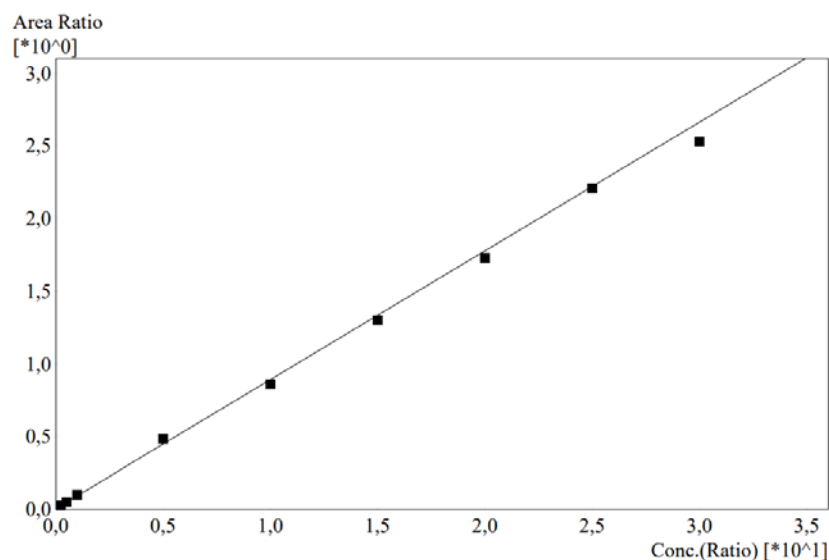


Рисунок 16 – Пример калибровочного графика для этмабена из валидационного цикла № 1 в координатах отношение площади пика этмабена к площади пика прометазина от отношения концентрации этмабена к концентрации прометазина в плазме крови

За значение НПКО методики была принята минимальная концентрацию этмабена, поддающаяся надежному определению в плазме человека с RSD не более 20% и E не более $\pm 20\%$ [25, 122-124]. Значение НПКО этмабена в рамках аналитического диапазона № 1 составило 0,250 мкг/мл, в рамках аналитического диапазона № 2 после расширения диапазона методики – 0,040 мкг/мл [25].

На рисунке 17 приведена хроматограмма образца плазмы крови, соответствующего уровню контроля качества LLOQ с номинальной концентрацией в плазме крови 0,040 мкг/мл [25].

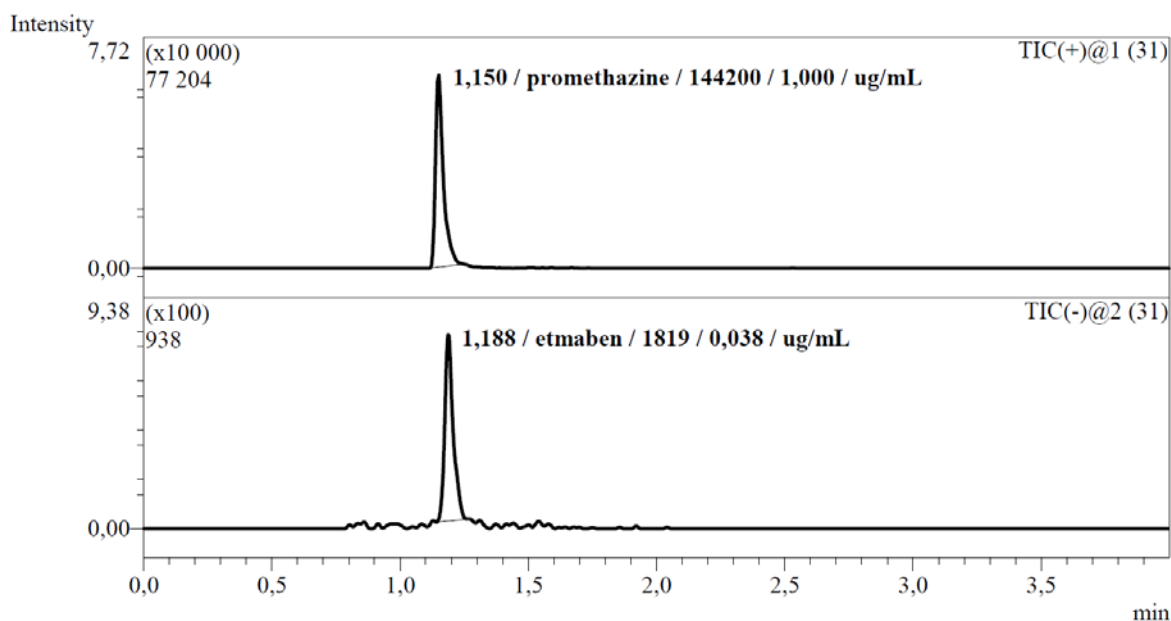


Рисунок 17 – Пример хроматограммы модельного образца плазмы крови, соответствующего контролю качества этмабена на уровне LLOQ с номинальной концентрацией 0,040 мкг/мл (первый сектор TIC(+))@1 хроматограммы – детекция прометазина; второй сектор TIC(-))@2 хроматограммы – детекция этмабена)

3.2.2.5 Оценка правильности и прецизионности

Проводилась оценка правильности и прецизионности внутри и между циклами. В валидационных циклах 1, 2, 3, 5 проводился последовательный анализ 5 образцов контролей качества уровней LLOQ, L, M1, M2, M3, H. В валидационном цикле 4 проводился последовательный анализ 5 образцов контролей качества уровней LLOQ, L, M1, M2, M3, M4, H [25].

На основании полученных данных были рассчитаны значения E и RSD для оценки правильности и прецизионности соответственно. Значения E не превышали $\pm 20\%$ для уровня LLOQ, $\pm 15\%$ - для остальных уровней [25, 122-124]. Значения RSD не превышали 20% для уровня LLOQ, 15% - для остальных уровней [25, 122-124]. Концентрации этмабена, полученные при анализе модельных образцов для оценки правильности и прецизионности, представлены в таблице 25. Результаты оценки правильности и прецизионности внутри циклов 1–5 и между циклами 1–3, 1–4, 1–5 представлены в таблице 26. Рассчитанные значения RSD и E соответствовали критериям приемлемости [25, 122-124].

Таблица 25 – Значения концентраций, полученные при анализе модельных образцов для оценки правильности и прецизионности

Уровень	Концентрация этмабена, мкг/мл				
	Цикл №1	Цикл №2	Цикл №3	Цикл №4	Цикл №5
LLOQ	0,274	0,281	0,274	0,043	0,220
	0,270	0,283	0,272	0,039	0,212
	0,277	0,257	0,262	0,035	0,230
	0,242	0,278	0,259	0,045	0,246
	0,235	0,240	0,266	0,037	0,233
L	0,728	0,852	0,704	0,111	0,718
	0,828	0,817	0,749	0,134	0,750
	0,851	0,774	0,821	0,115	0,781
	0,820	0,833	0,793	0,119	0,709
	0,767	0,755	0,743	0,120	0,639
M1	1,607	1,598	1,666	0,184	1,631
	1,535	1,525	1,566	0,150	1,563
	1,602	1,534	1,570	0,167	1,475
	1,434	1,593	1,445	0,172	1,591
	1,622	1,470	1,483	0,157	1,386
M2	4,460	4,910	4,730	1,772	4,655
	4,721	4,895	4,991	1,517	4,723
	4,995	4,768	4,992	1,578	4,951
	4,919	4,618	4,866	1,683	5,108
	4,422	4,595	4,392	1,748	4,843
M3	19,971	20,450	16,337	5,185	18,525
	16,659	18,969	16,442	5,120	16,149
	17,354	19,550	17,655	4,621	18,133
	16,951	19,150	16,493	5,120	15,856
	16,920	19,619	17,628	4,865	16,023
M4	–	–	–	19,654	–
	–	–	–	18,134	–
	–	–	–	18,727	–
	–	–	–	18,650	–

Продолжение Таблицы 25

М4	–	–	–	17,990	–
Н	23,057	25,064	21,616	28,266	25,085
	21,519	27,159	23,212	24,633	22,022
	21,813	23,740	20,743	25,161	21,863
	23,699	25,432	21,862	25,248	21,743
	21,622	27,722	23,421	23,973	22,470

Таблица 26 – Результаты оценки правильности и прецизионности внутри и между циклами

Уровень	Номинальное значение концентрации, нг/мл	Значение RSD, %								Значение E, %							
		Внутри цикла					Между циклами			Внутри цикла (n=5)					Между циклами		
		Цикл №1 (n=5)	Цикл №2 (n=5)	Цикл №3 (n=5)	Цикл №4 (n=5)	Цикл №5 (n=5)	Циклы №1-3 (n=15)	Циклы №1-4 (n=20)	Циклы №1-5 (n=25)	Цикл №1 (n=5)	Цикл №2 (n=5)	Цикл №3 (n=5)	Цикл №4 (n=5)	Цикл №5 (n=5)	Циклы №1-3 (n=15)	Циклы №1-4 (n=20)	Циклы №1-5 (n=25)
LLOQ	0,250	7,54	6,98	2,40	-	5,68	5,79	5,79	8,49	3,84	7,12	6,64	-	-8,72	5,87	5,87	2,22
	0,040	-	-	-	10,42	-	-	10,42	10,42	-	-	-	-0,50	-	-	-0,50	-0,50
L	0,750	6,28	5,03	5,99	-	7,39	5,92	5,92	7,29	6,51	7,49	1,60	-	-4,08	5,20	5,20	2,88
	0,120	-	-	-	7,26	-	-	7,26	7,26	-	-	-	-0,17	-	-	-0,17	-0,17
M1	1,500	5,00	3,44	5,56	-	6,44	4,43	4,43	4,84	4,00	2,93	3,07	-	1,95	3,33	3,33	2,99
	0,175	-	-	-	7,96	-	-	7,96	7,96	-	-	-	-5,14	-	-	-5,14	-5,14
M2	4,500	5,53	3,12	5,20		3,72	4,46	4,46	4,29	4,52	5,72	6,54	-	7,91	5,59	5,59	6,17
	1,750	-	-	-	6,60	-	-	6,60	6,60	-	-	-	-5,17	-	-	-5,17	-5,17
M3	18,000	7,77	2,93	3,96	-	7,57	8,04	8,04	8,21	-2,38	8,60	-6,05	-	-5,90	0,05	0,05	-1,43
	5,250	-	-	-	4,74	-	-	4,74	4,74	-	-	-	-5,10	-	-	-5,10	-5,10
M4	21,000	-	-	-	3,51	-	-	3,51	3,51	-	-	-	-11,28	-	-	-11,28	-11,28
H	24,000	4,38	6,26	5,09	-	6,17	8,97	8,97	8,38	-6,91	7,60	-7,62	-	-5,68	-2,31	-2,31	-3,15
	28,000	-	-	-	6,49	-	-	6,49	6,49	-	-	-	-9,08	-	-	-9,08	-9,08

3.2.2.6 Оценка степени извлечения

Был проведен анализ по 3 образца уровней L, M1, M2, M3, H, приготовленных без влияния степени извлечения на интактной плазме крови, гемолизной интактной плазме крови и хилезной интактной плазме крови, а также по 3 образца уровня L, M1, M2, M3, H для оценки степени извлечения из различных видов интактной матрицы. Значения площадей, полученных при анализе образцов без влияния степени извлечения и образцов для оценки степени извлечения, рассчитанные значения отношений площадей этмабена к прометазину в образцах без влияния степени извлечения и образцах для оценки степени извлечения представлены в таблице 27 [25].

Среднее значение СИ этмабена составило 90,26%, что является достаточным при соответствии результатов RSD критериям приемлемости (RSD не более 15%). Рассчитанное RSD составило 12,81%, что соответствует требованиям (таблица 27) [25, 122-124].

Таблица 27 – Результаты оценки степени извлечения в методике определения этмабена

Вид матрицы	Уровень	Образцы без влияния степени извлечения			Образцы для оценки степени извлечения			Степень извлечения, %
		Значение площади пика		Значение площадей пиков этмабена/прометазина	Значение площади пика		Значение площадей пиков этмабена/прометазина	
		Этмабен	Прометазин		Этмабен	Прометазин		
Интактная плазма крови	L	51635	635510	0,081	41745	620375	0,067	82,82
		53581	636749	0,084	44629	642665	0,069	82,53
		57440	618796	0,093	54136	609983	0,089	95,61
	M1	80835	546024	0,148	78842	608759	0,130	87,48
		85104	653486	0,130	91753	620503	0,148	113,54
		107342	617384	0,174	97168	598598	0,162	93,36
	M2	276483	604430	0,457	250738	628188	0,399	87,26
		277878	630243	0,441	271907	638421	0,426	96,60
		316917	624627	0,507	296545	599413	0,495	97,51
	M3	1002785	644032	1,557	813911	538558	1,511	97,06
		1002614	630993	1,589	867373	649368	1,336	84,06
		1126220	638005	1,765	934005	631279	1,480	83,82
	H	1309104	601319	2,177	1064040	632573	1,682	77,26
		1321000	638929	2,068	1141243	605588	1,885	91,15
		1452330	593802	2,446	1319935	612256	2,156	88,14
Интактная гемолизная плазма	L	48660	572159	0,085	44126	677890	0,065	76,54
		47707	640275	0,075	38334	734262	0,052	70,07
		57085	633225	0,090	46126	721003	0,064	70,97
	M1	86044	601823	0,143	77187	596562	0,129	90,50
		90357	645866	0,140	83283	669043	0,124	88,98
		102878	646698	0,159	94231	629059	0,150	94,16
	M2	271076	622012	0,436	238062	552890	0,431	98,80

Продолжение Таблицы 27

Интактная гемолизная плазма	M2	267727	649850	0,412	269402	662274	0,407	98,74	
		311658	623793	0,500	239871	649684	0,369	73,90	
	M3	883305	703418	1,256	877863	520053	1,688	134,43	
		989354	645615	1,532	855056	586367	1,458	95,16	
		1059190	615636	1,720	1028345	581084	1,770	102,86	
	H	1382551	584075	2,367	1118837	533618	2,097	88,58	
		1340671	657181	2,040	1120643	608517	1,842	90,27	
		1339524	559665	2,393	1217016	564766	2,155	90,03	
	Интактная хилезная плазма крови	L	51082	595063	0,086	42108	644559	0,065	76,10
50628			624951	0,081	39322	626697	0,063	77,45	
53433			597021	0,089	48588	623966	0,078	87,01	
M1		89070	629866	0,141	84980	662843	0,128	90,66	
		96504	670992	0,144	84048	628177	0,134	93,03	
		114617	585357	0,196	94693	618813	0,153	78,15	
M2		266615	638329	0,418	264353	627458	0,421	100,87	
		263045	635192	0,414	250300	648684	0,386	93,18	
		307041	623401	0,493	290372	635264	0,457	92,81	
M3		1023700	627127	1,632	855751	586849	1,458	89,33	
		876313	640029	1,369	881874	621861	1,418	103,57	
		999935	599322	1,668	941531	552592	1,704	102,12	
H		1419986	573216	2,477	1134358	593819	1,910	77,11	
		1362821	614167	2,219	1136778	622846	1,825	82,25	
		1467585	591405	2,482	1345568	565787	2,378	95,84	
Среднее значение степени извлечения, %								90,26	
RSD, %								12,81	

3.2.2.7 Оценка переноса пробы

При проведении оценки переноса пробы в рамках валидационных циклов № 1–3 проводился анализ холостых образцов после предварительного анализа калибровочного образца, соответствующего уровню ВПКО (калибровочный образец № 9) [25].

Отношение площадей пиков этмабена, полученных на холостых образцах, к среднему значению площади пиков этмабена, полученных при анализе образцов LLOQ, не должно превышать 20%. Фактический результат составил 3,47%, 0% и 17,06% для циклов 1-3 соответственно, что соответствует требованиям [25, 122-124].

Отношение значений площадей пиков прометазина, полученных на холостых образцах, к среднему значению площади пиков прометазина, полученному при анализе образцов LLOQ, не должно превышать 5%. Фактический результат составил 0,68%, 0,90%, 1,00% для циклов 1–3 соответственно, что соответствует требованиям [25, 122-124].

Значение площадей, полученных при оценке переноса пробы, а также рассчитанное отношение площадей представлено в таблице 28.

Таблица 28 – Оценка переноса пробы

№ цикла	Образец	Значение площади пика		Отношение площадей, %	
		Этмабен	Прометазин	Этмабен	Прометазин
1	LLOQ	20239	678462	–	–
		19849	674264		
		20788	690783		
		17941	664058		
		17747	673954		
	<i>Среднее значение</i>	19313	676304		
	Холостой образец	670	4605	3,47	0,68
2	LLOQ	14923	623381	–	–
		14596	606162		
		13362	600551		
		13942	587849		
		13042	618685		

Продолжение Таблицы 28

2	<i>Среднее значение</i>	13973	607326	-	-
	Холостой образец	0	5494	0,00	0,90
3	LLOQ	17664	574077	—	—
		16885	553265		
		16271	549763		
		16197	552842		
		16632	555322		
	<i>Среднее значение</i>	16730	557054		
	Холостой образец	2854	5570	17,06	1,00

3.2.2.8 Оценка различных видов стабильности

Были изучены различные виды стабильности:

- настольная стабильность при хранении при комнатной температуре;
- постпрепаративная стабильность при хранении в автосамплере хроматографа в течение 29 часов;
- стабильность модельных образцов спустя пять циклов замораживания в течение не менее 60 часов при $-42,5 \pm 7,5$ °C и размораживания в течение не менее 10 часов при 20 ± 5 °C;
- стабильность стандартных растворов в течение 112 дней при $-42,5 \pm 7,5$ °C;
- долгосрочная стабильность модельных образцов, оцененная методом брекетинга проводилась в два этапа:
 - о при -20 ± 5 °C и при -75 ± 10 °C в течение 112 дней (этап 1);
 - о при -20 ± 5 °C и при -75 ± 10 °C в течение 234 дней (этап 2) [25].

Рассчитанные значения E для каждого образца не превышали $\pm 15\%$, что соответствует требованиям [25, 122-124]. Результаты оценки стабильности этмабена в образцах на уровнях L и H представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Оценка различных видов стабильности этмабена в образцах на уровне L и H

Вид стабильности	Уровень L			Уровень H		
	Концентрация этмабена, мкг/мл	Среднее значение, мкг/мл	Е, %	Концентрация этмабена, мкг/мл	Среднее значение, мкг/мл	Е, %
Настольная	0,681	0,706	-5,89	18,868	20,468	-14,72
	0,739			22,050		
	0,693			20,929		
	0,690			20,539		
	0,726			19,956		
Постпрепаративная	0,935	0,833	11,01	23,756	22,808	-4,97
	0,871			23,203		
	0,824			21,188		
	0,795			22,933		
	0,738			22,959		
При пятикратной заморозке- разморозке	0,744	0,763	1,68	24,329	23,298	-2,92
	0,782			22,941		
	0,759			24,252		
	0,792			23,071		
	0,736			21,899		
Долгосрочная при - 20 °С (этап 1)	0,746	0,740	-1,36	24,054	23,001	-4,16
	0,733			23,125		
	0,784			21,595		
	0,729			24,343		
	0,707			21,889		
Долгосрочная при - 80 °С (этап 1)	0,709	0,808	7,68	23,175	22,631	-5,71
	0,835			21,215		
	0,794			21,597		
	0,923			23,260		
	0,777			23,907		
Долгосрочная при -20 °С (этап 2)	0,709	0,740	-1,36	20,995	21,780	-9,25
	0,702			21,127		
	0,800			22,666		
	0,728			22,306		
	0,760			21,804		

Продолжение Таблицы 29

Долгосрочная при -80 °С (этап 2)	0,689	0,705	-6,05	22,644	22,154	-7,69
	0,712			21,404		
	0,699			22,803		
	0,686			21,557		
	0,737			22,364		
Стабильность исходных растворов	0,862	0,789	5,23	21,903	22,241	-7,33
	0,813			23,261		
	0,736			20,940		
	0,744			22,003		
	0,791			23,096		
Стабильность рабочих растворов	0,808	0,768	2,45	21,621	22,256	-7,27
	0,733			22,344		
	0,808			21,662		
	0,734			22,406		
	0,759			23,246		

3.3 Практическое применение разработанной методики – исследование фармакокинетики малобена

Разработанная и валидированная методика количественного определения малобена в плазме крови человека была применена при изучении концентраций малобена в образцах добровольцев в рамках клинического исследования препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). Был проведен анализ 864 образцов от 24 рандомизированных добровольцев, принимающих участие в исследовании по протоколу № СРНУ-4DN-01-2022 [93].

Пример хроматограммы добровольца, участвующего в данном исследовании, спустя 12 ч после приема малобена в суточной дозе 120 мг представлен на рисунке 18.

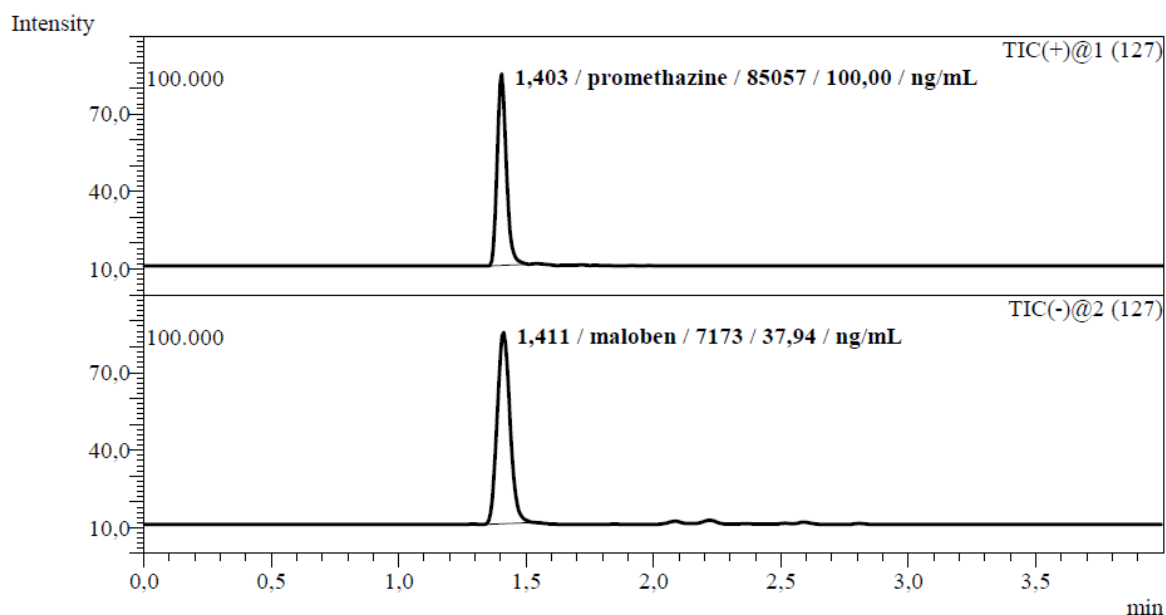


Рисунок 18 – Пример хроматограммы добровольца спустя 12 ч после приема малобена в суточной дозе 120 мг (первый сектор TIC(+)@1 хроматограммы – детекция прометазина; второй сектор TIC(-)@2 хроматограммы – детекция малобена)

Всего был проведен анализ 7 аналитических циклов. В каждый аналитический цикл помимо образцов от добровольцев входили калибровочные образцы для построения калибровочной кривой, холостые образцы, нулевой калибровочных образец, а также образцы контроля качества в двух повторностях. Результаты оценки калибровочных образцов в каждом цикле соответствовали критериям приемлемости (для не менее 75% калибровочных образцов не менее 6 уровней значение E, % находилось в пределах от -20% до +20% для калибровочного образца № 1, в пределах от -15% до +15% – для остальных калибровочных образцов). Значение RSD, % для не менее 67% образцов контроля качества укладывались в 15% [122-124].

В ходе оценки правильности и прецизионности между аналитическими циклами рассчитывались значения E, % и RSD, % между аналитическими циклами № 1–7. Значения E, % укладывались в диапазон от -15% до +15%, значения RSD, % укладывались в 15% [122-124]. Концентрации образцов контроля качества в аналитических циклах вместе с рассчитанными средними значениями для каждого уровня контроля качества, E, % и RSD, % представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Оценка правильности и прецизионности для образцов контроля качества между аналитическими циклами 1–7 для малобена

№ аналитического цикла	Найденная концентрация малобена, нг/мл				
	L	M1	M2	M3	H
1	2,00	6,82	28,57	73,09	109,99
	1,99	6,46	27,01	66,96	106,18
2	2,58	7,39	28,33	72,50	136,87
	2,15	7,28	27,96	65,43	120,45
3	2,54	7,08	31,88	81,91	134,48
	2,58	7,25	29,97	83,89	134,00
4	2,10	6,60	26,80	68,95	111,51
	1,96	7,35	30,97	82,27	134,98
5	2,34	8,16	29,35	73,13	124,91
	2,51	7,93	25,68	73,36	117,45
6	2,19	7,48	32,24	78,61	137,04
	2,52	7,51	32,15	85,89	131,58
7	2,02	7,01	29,51	77,97	124,26
	1,99	6,55	32,12	83,98	113,44
Среднее значение	2,25	7,21	29,47	76,28	124,08
RSD, %	11,18	6,91	7,42	8,81	8,83
E, %	-0,10	-3,93	-1,78	1,71	3,40

С целью подтверждения достоверности полученных при анализе данных был проведен повторный выборочный анализ 12,73% образцов (110 образцов) для определения сопоставимости результатов первого и повторного анализов. Относительная погрешность результатов анализов не превышала 20% для не менее чем 85,45% проб, что соответствует критериям приемлемости (не менее 67% проб с погрешностью не более 20%) и подтверждает воспроизводимость результатов [122-124].

На основании концентраций, полученных при анализе образцов плазмы крови добровольцев после приема исследуемого препарата «Малобен», таблетки,

60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) был проведен фармакокинетический анализ. Были изучены фармакокинетические параметры препарата малобена при однократном и многократном режимах дозирования, а также проведена оценка дозовой пропорциональности.

3.3.1 Исследование фармакокинетики малобена при однократном дозировании

Результаты оценки фармакокинетических параметров малобена при однократном применении исследуемого препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) представлены в таблице 31. Для всех параметров, кроме $t_{\max}$, приведены значения $\text{Mean} \pm \text{SD} [n]$ (Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра $t_{\max}$ приведены значения $\text{Median} (\text{Min} - \text{Max}) [n]$ (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение, n – размер выборки) [93].

Таблица 31 – Сводная таблица фармакокинетических параметров малобена после однократного приема исследуемого препарата в когортах 1–3

Доза, когорта ФК параметр	60 мг, когорта 1	120 мг, когорта 2	180 мг, когорта 3
$C_{\max}$, нг/мл	$18,09 \pm 8,06 [8]$	$41,36 \pm 5,63 [8]$	$51,81 \pm 11,05 [8]$
$t_{\max}$, ч	6 (0,5-8) [8]	0,75 (0,33-16) [8]	0,5 (0,33-8) [8]
$AUC_{(0-t)}$, нг·ч/л	$348,59 \pm 200,65 [8]$	$938,32 \pm 344,95 [8]$	$1177,13 \pm 221,81 [8]$
$AUC_{(0-\infty)}$, нг·ч/л	$623,05 \pm 390,08 [8]$	$1171,68 \pm 471,89 [8]$	$1666,93 \pm 596,25 [8]$
k_{el} , ч ⁻¹	$0,028 \pm 0,026 [8]$	$0,038 \pm 0,017 [8]$	$0,035 \pm 0,020 [8]$
$t_{1/2}$, ч	$47,38 \pm 33,50 [8]$	$22,26 \pm 12,33 [8]$	$26,92 \pm 17,53 [8]$
MRT , ч	$68,16 \pm 42,00 [8]$	$36,75 \pm 24,89 [8]$	$50,71 \pm 20,35 [8]$
V_d , л	$7041,79 \pm 4033,42 [8]$	$3469,10 \pm 1339,08 [8]$	$4012,01 \pm 1408,07 [8]$
Cl , л/ч	$160,67 \pm 146,40 [8]$	$120,98 \pm 55,73 [8]$	$117,95 \pm 32,56 [8]$

Усредненные фармакокинетические профили малобена в линейной шкале после однократного приема ИП в дозах 60, 120 и 180 мг в когортах 1–3 представлены на рисунке 19 [93].

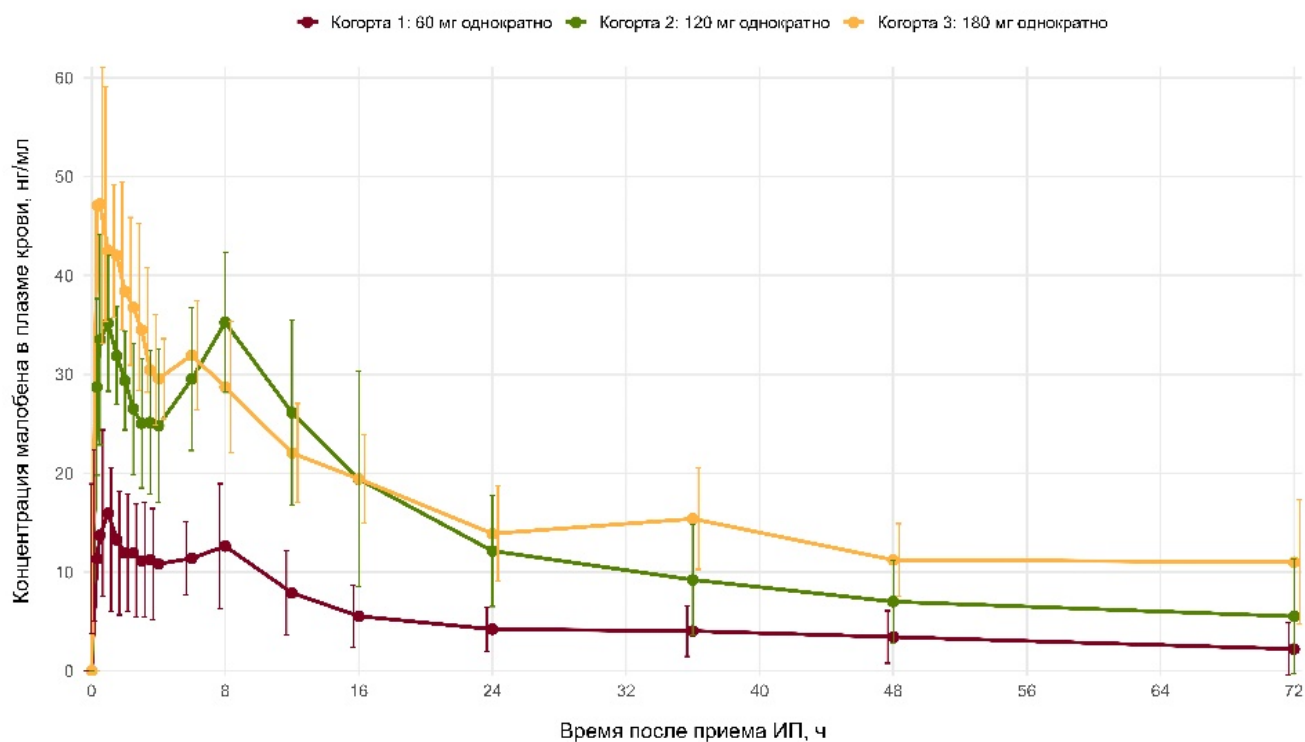
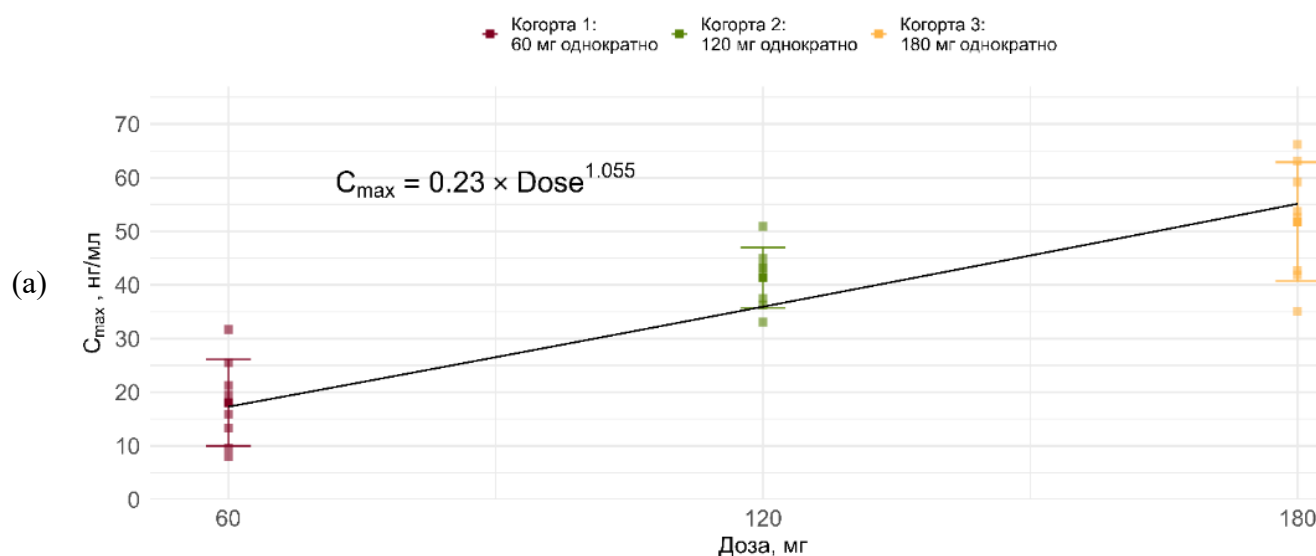


Рисунок 19 – Усредненные фармакокинетические профили малобена в линейной шкале после однократного приема препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

На рисунке 20 представлены индивидуальные значения основных ФК параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями и аппроксимацией степенной функцией для когорт 1–3 после однократного дозирования исследуемого препарата [93].



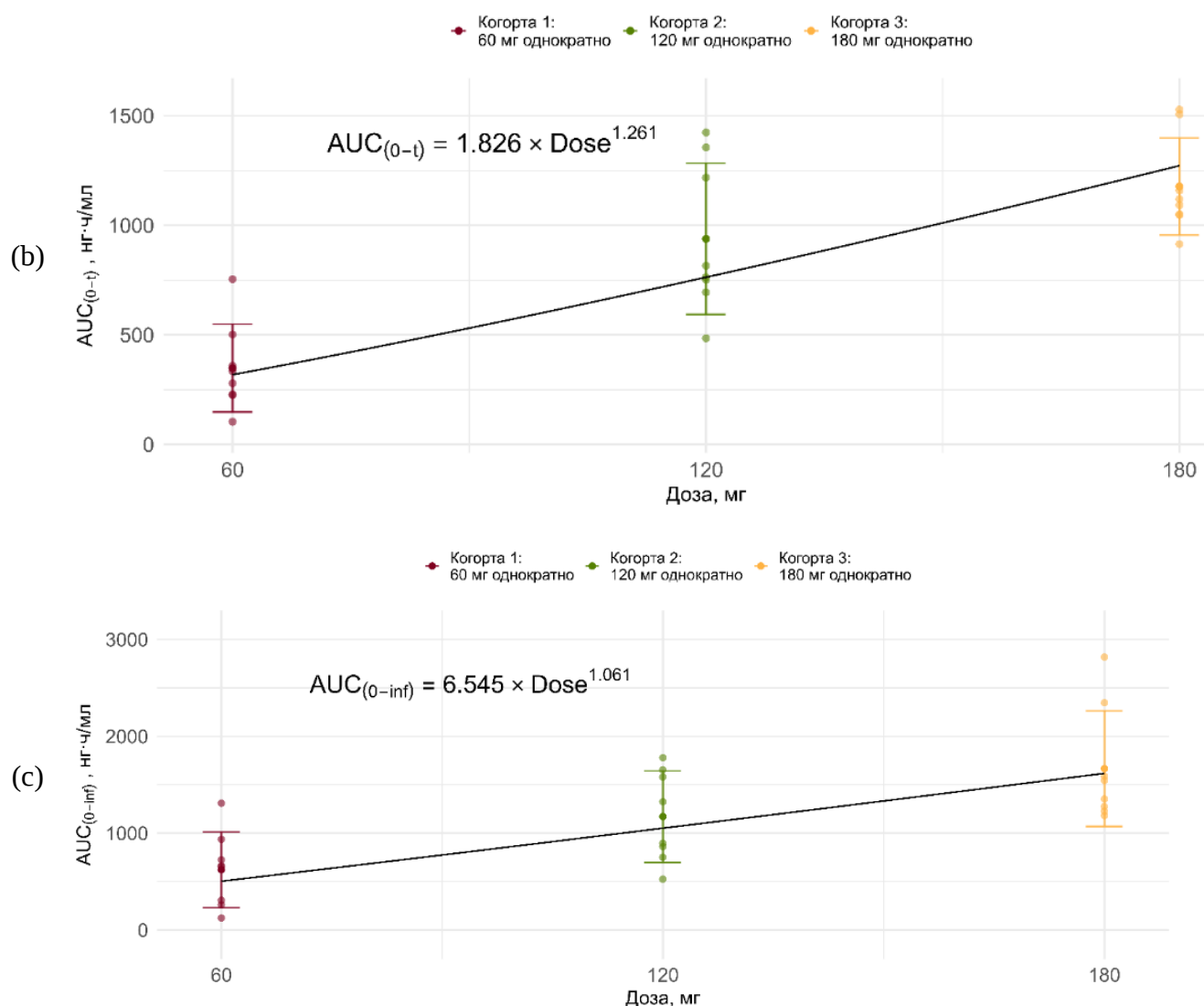
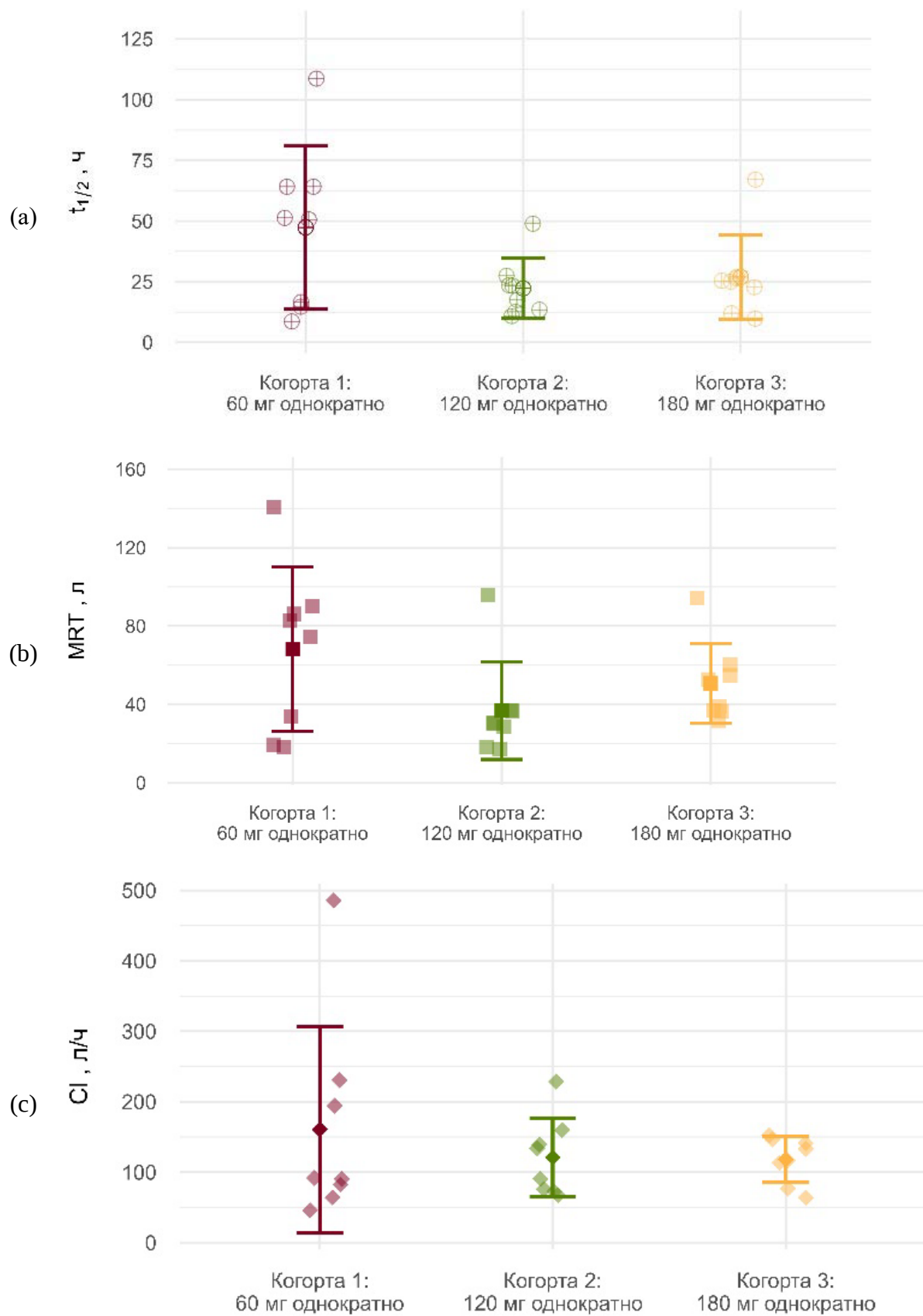


Рисунок 20 – Индивидуальные значения параметров $C_{\max}$ (а), $AUC_{(0-t)}$ (b), $AUC_{(0-\infty)}$ (с) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями в когортах 1–3 при однократном приеме препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

На рисунке 21 представлены индивидуальные значения дополнительных фармакокинетических параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями для когорт 1–3 после однократного дозирования исследуемого препарата [93].



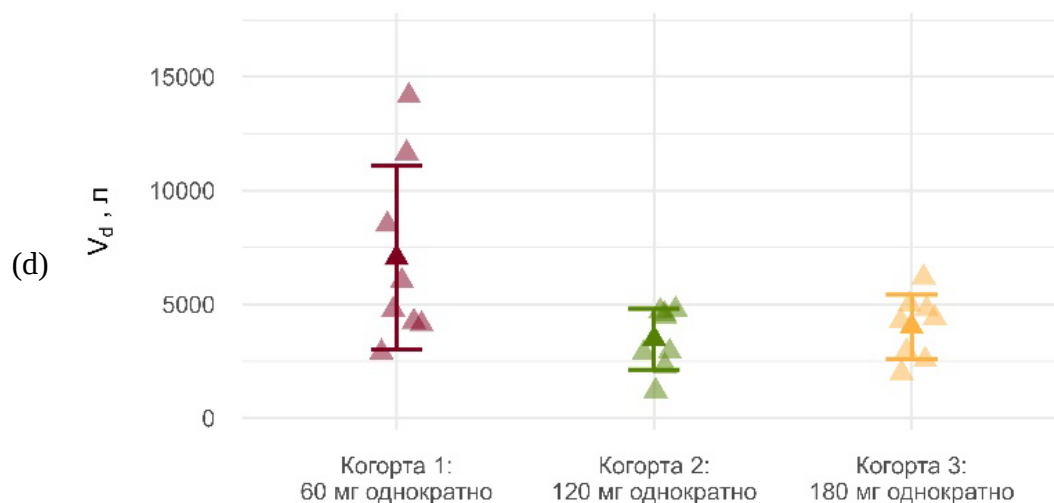


Рисунок 21 – Индивидуальные значения параметров $t_{1/2}$ (a), MRT (b), Cl (c) и V_d (d) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями в когортах 1–3 при однократном приеме препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

В таблице 32 приведены результаты оценки дозовой пропорциональности основных ФК параметров после однократного дозирования исследуемого препарата. При однократном приеме исследуемого препарата (ИП) значения коэффициента β для $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$, рассчитанные с помощью степенной модели после логарифмического преобразования, составили 1,055 (90% ДИ: 0,807–1,303), 1,261 (90% ДИ: 0,935–1,586) и 1,061 (90% ДИ: 0,647–1,475) соответственно [93].

Таблица 32 – Оценка дозовой пропорциональности малобена на основе степенной модели

Режим дозирования	Параметр	β (Mean $\pm$ SE)	90% ДИ	Границы признания дозовой пропорциональности
Однократное дозирование (когорты 1–3)	$C_{\max}$	1,055 $\pm$ 0,145	0,807–1,303	[0,369; 1,631]
	$AUC_{(0-t)}$	1,261 $\pm$ 0,190	0,935–1,586	
	$AUC_{(0-\infty)}$	1,061 $\pm$ 0,241	0,647–1,475	

Примечание. β – коэффициент дозовой пропорциональности; Mean – среднее арифметическое; SE – стандартная ошибка; CI – доверительный интервал. Границы признания дозовой пропорциональности рассчитаны по формуле $[1 + \frac{\ln(Q_L)}{\ln(R)}; 1 + \frac{\ln(Q_U)}{\ln(R)}]$, где R – отношение наибольшей и наименьшей изучаемых доз (R= 3); Q_L – нижняя граница ($Q_L = 0,5$); Q_U – верхняя граница ($Q_U = 2,0$) [93, 129].

3.3.2 Исследование фармакокинетики малобена при многократном дозировании

Результаты оценки фармакокинетических параметров малобена при многократном применении исследуемого препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) представлены в таблице 33. Для всех параметров, кроме $t_{\max}$, приведены значения $\text{Mean} \pm \text{SD} [n]$ (Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра $t_{\max}$ приведены значения $\text{Median} (\text{Min} - \text{Max}) [n]$ (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение, n – размер выборки) [93].

Таблица 33 – Сводная таблица фармакокинетических параметров малобена после многократного приема исследуемого препарата в когортах 4–6

Доза, когорта ФК параметр	Суточная доза 60 мг, когорта 4	Суточная доза 120 мг, когорта 5	Суточная доза 180 мг, когорта 6
$C_{\max}$, нг/мл	37,93 $\pm$ 20,98 [8]	70,83 $\pm$ 37,37 [8]	78,98 $\pm$ 37,03 [8]
$t_{\max}$, ч	0,75 (0,33-8) [8]	2 (0,33-8) [8]	0,5 (0,33-16) [8]
$AUC_{(0-t)}$, нг·ч/л	3142,22 $\pm$ 2091,08 [8]	5714,73 $\pm$ 2482,56 [8]	7799,02 $\pm$ 3829,67 [8]
$AUC_{(0-\infty)}$, нг·ч/л	3228,41 $\pm$ 2141,08 [8]	5789,32 $\pm$ 2539,34 [8]	8970,72 $\pm$ 5143,42 [8]
k_{el} , ч ⁻¹	0,052 $\pm$ 0,028 [8]	0,057 $\pm$ 0,018 [8]	0,032 $\pm$ 0,025 [8]
$t_{1/2}$, ч	16,61 $\pm$ 7,33 [8]	13,09 $\pm$ 3,89 [8]	33,68 $\pm$ 20,79 [8]
MRT , ч	151,87 $\pm$ 4,39 [8]	150,59 $\pm$ 2,70 [8]	165,53 $\pm$ 14,99 [8]
V_d , л	535,60 $\pm$ 301,80 [8]	442,07 $\pm$ 190,62 [8]	996,54 $\pm$ 378,55 [8]
Cl , л/ч	23,71 $\pm$ 10,66 [8]	25,74 $\pm$ 14,53 [8]	28,54 $\pm$ 20,07 [8]

Усредненные фармакокинетические профили малобена в линейной шкале относительно последнего приема ИП после приема в течение 7 дней в суточных дозах 60, 120 и 180 мг в когортах 4–6 представлены на рисунке 22 [93].

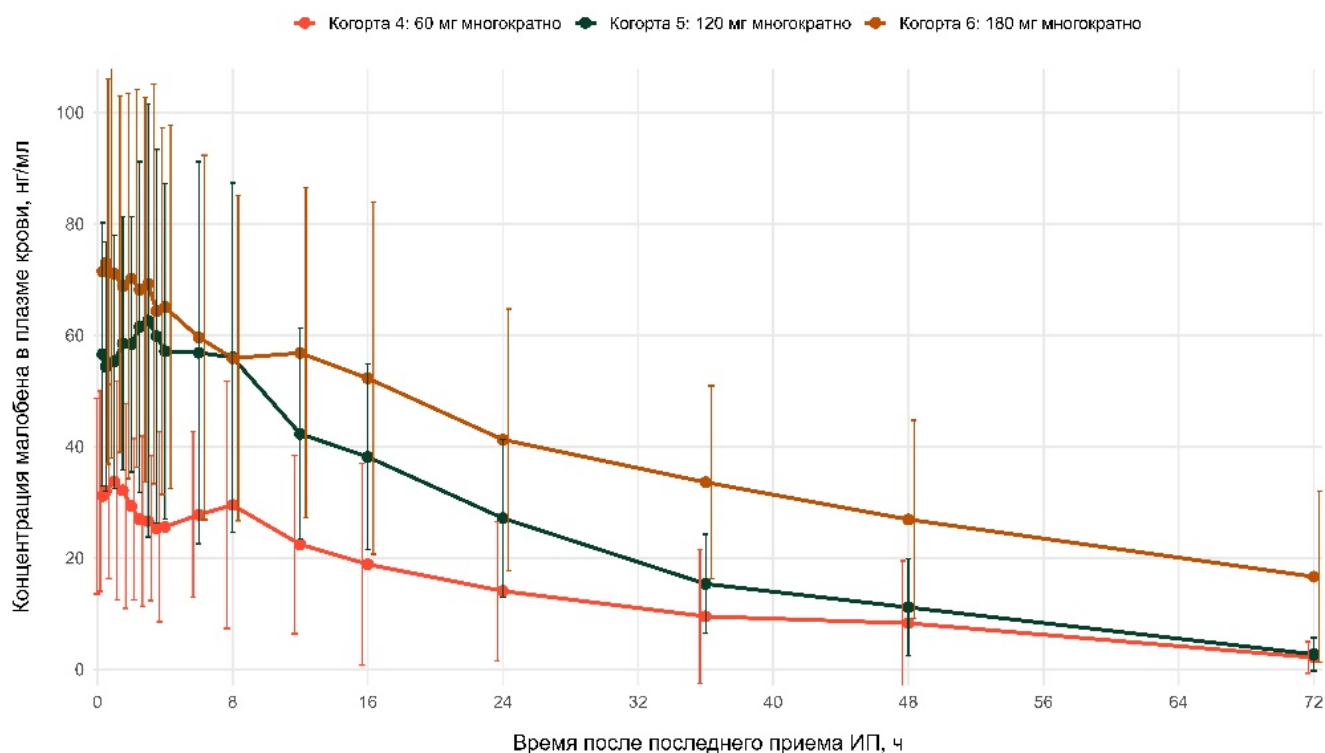
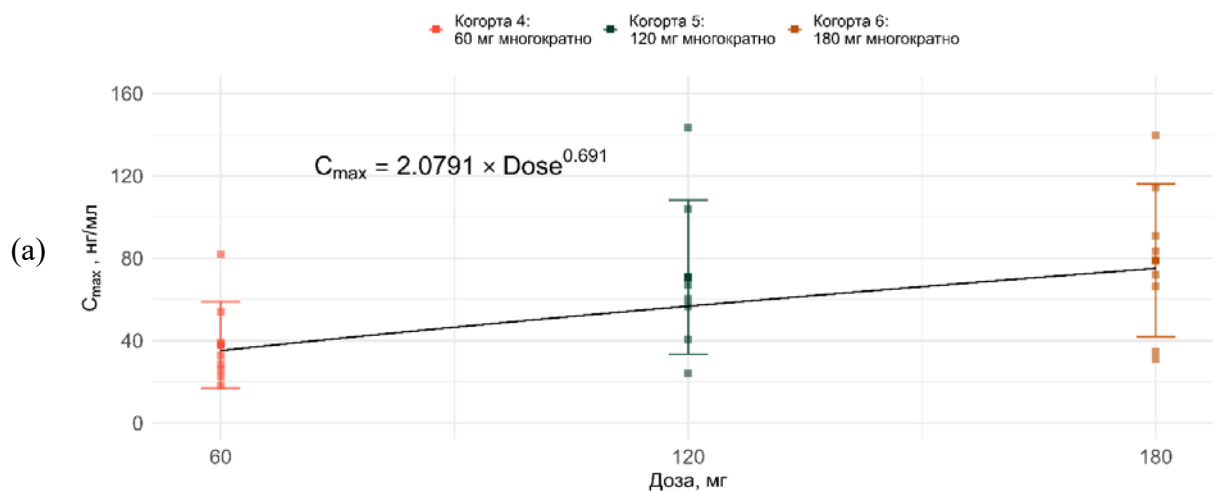


Рисунок 22 – Усредненные фармакокинетические профили малобена в линейной шкале после многократного приема препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в течение 7 дней

На рисунке 23 представлены индивидуальные значения основных ФК параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями и аппроксимацией степенной функцией для когорт 4–6, соответствующие многократному режиму дозирования [93].



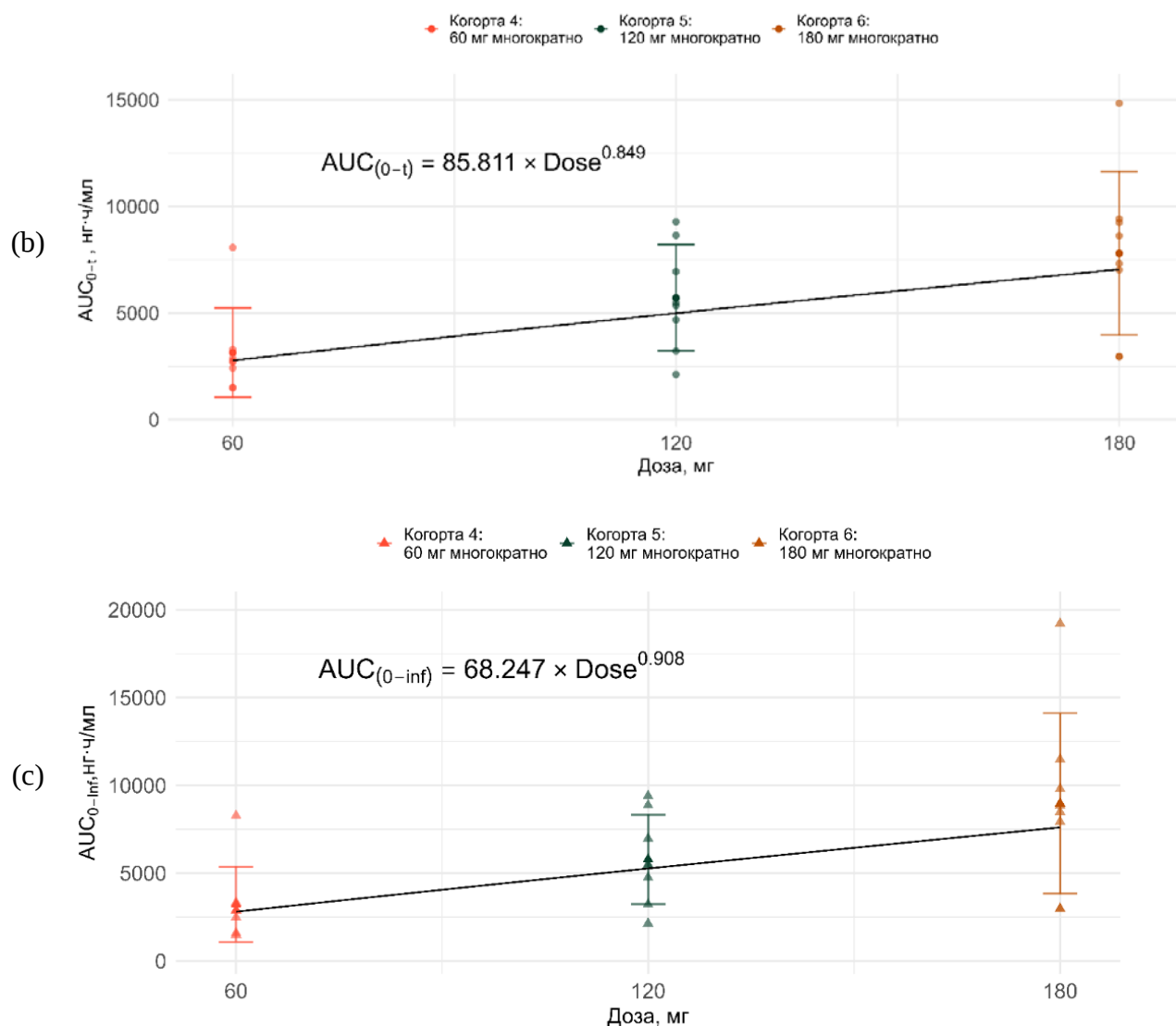
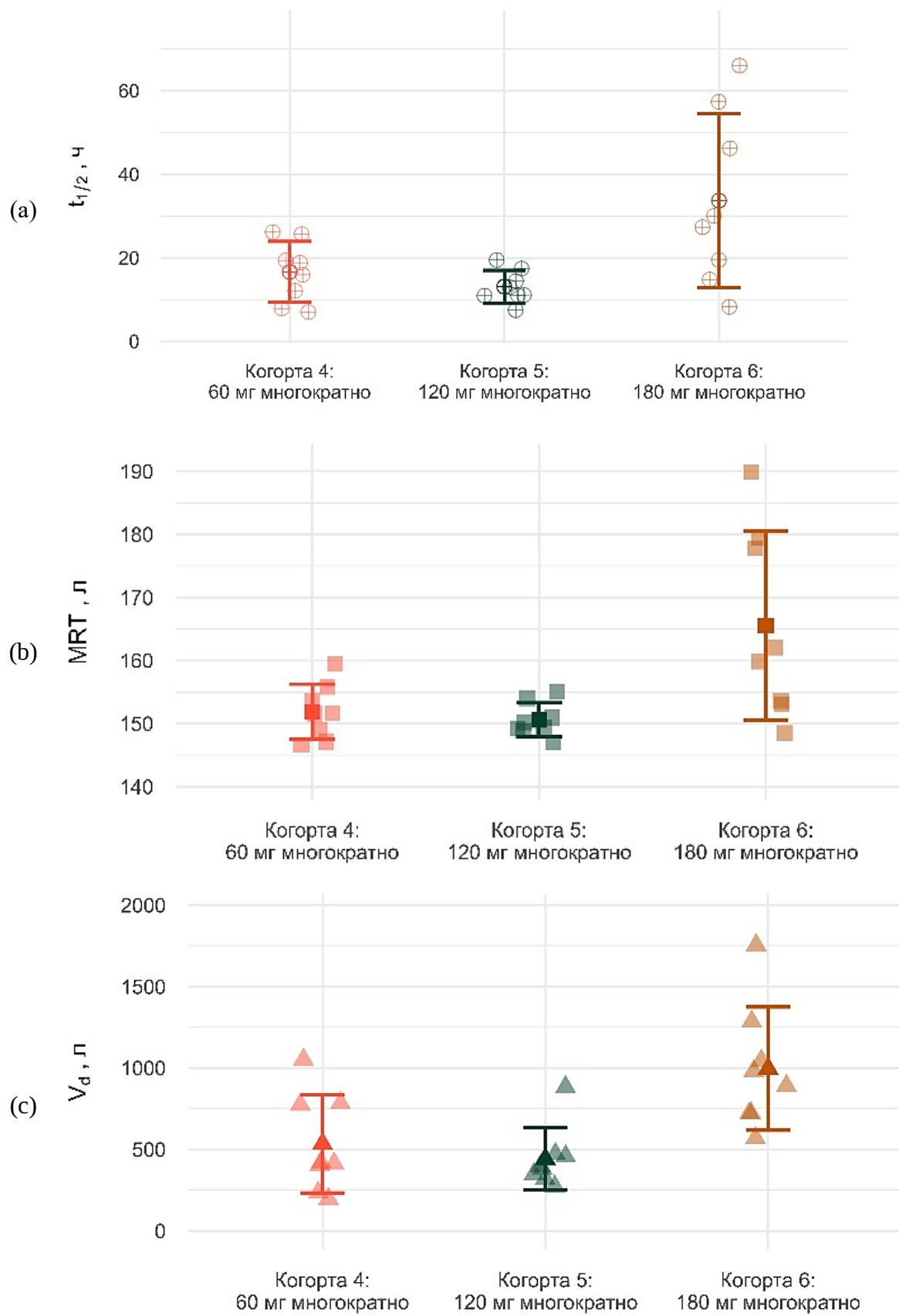


Рисунок 23 – Индивидуальные значения параметров $C_{\max}$ (a), $AUC_{(0-t)}$ (b), $AUC_{(0-\infty)}$ (c) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями в когортах 4–6 при многократном приеме препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

На рисунке 24 представлены индивидуальные значения дополнительных ФК параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями для когорт 4–6 после многократного приема исследуемого препарата [93].



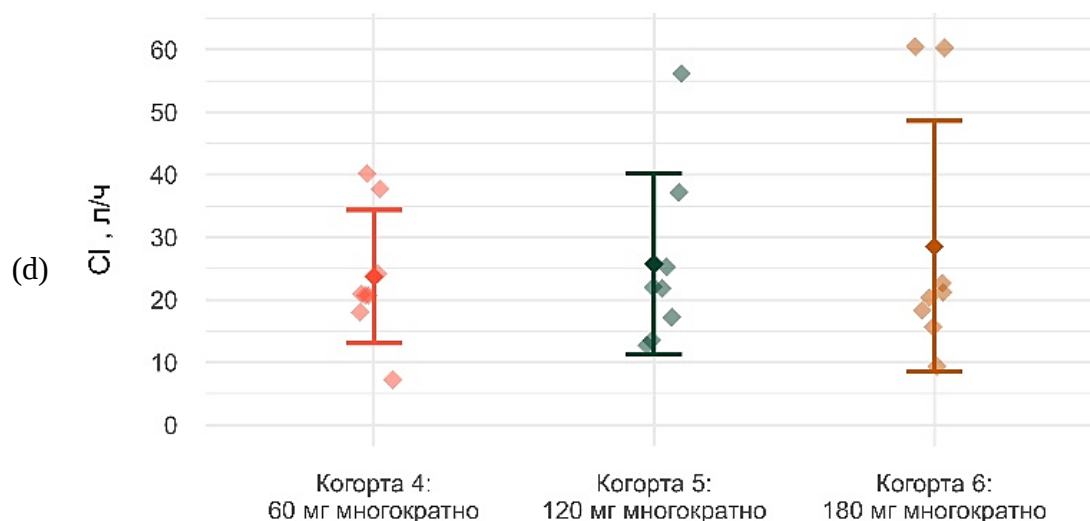


Рисунок 24 – Индивидуальные значения параметров $t_{1/2}$ (a), MRT (b), V_d (c), Cl (d) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями в когортах 4–6 при многократном приеме препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

В таблице 34 приведены результаты оценки дозовой пропорциональности основных ФК параметров после многократного дозирования. При многократном приеме значения коэффициента β для $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ – 0,691 (90% ДИ: 0,292–1,089), 0,849 (95% ДИ: 0,447–1,251) и 0,908 (95% ДИ: 0,485–1,330) [93].

Таблица 34 – Оценка дозовой пропорциональности малобена на основе степенной модели

Режим дозирования	Параметр	β (Mean $\pm$ SE)	90% ДИ	Границы признания дозовой пропорциональности
Многократное дозирование (когорты 4–6)	$C_{\max}$	0,691 $\pm$ 0,232	0,292–1,089	[0,369; 1,631]
	$AUC_{(0-t)}$	0,849 $\pm$ 0,234	0,447–1,251	
	$AUC_{(0-\infty)}$	0,908 $\pm$ 0,246	0,485–1,330	

Примечание. β – коэффициент дозовой пропорциональности; Mean – среднее арифметическое; SE – стандартная ошибка; CI – доверительный интервал. Границы признания дозовой пропорциональности рассчитаны по формуле $[1 + \frac{\ln(Q_L)}{\ln(R)}; 1 + \frac{\ln(Q_U)}{\ln(R)}]$, где R – отношение наибольшей и наименьшей изучаемых доз (R= 3); Q_L – нижняя граница ($Q_L = 0,5$); Q_U – верхняя граница ($Q_U = 2,0$) [93, 129].

3.3.3 Обсуждение полученных результатов

Фармакокинетические кривые во всех когортах имеют схожий вид. Отмечается наличие двух фаз элиминации малобена. С увеличением дозы от 60 до 180 мг при однократном приеме препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) наблюдалось увеличение как значения $C_{\max}$, так и общей экспозиции ($AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$). Медианные значения $t_{\max}$ сокращались с увеличением дозы в когортах 1–3. Значения $t_{1/2}$, Cl , MRT и V_d варьировались между когортами без выраженной дозозависимости. Среднее значение Cl при однократном приеме ИП оставалось на уровне 117,95–160,67 л/ч. Средние значения V_d при однократном приеме ИП изменялись в пределах от 3469,10 л до 7041,79 л, что значительно превышает общий объем циркулирующей крови и свидетельствует об обширном распределении малобена в периферических тканях. После многократного приема ИП в течение 7 дней в суточных дозах от 60 до 180 мг также отмечалось увеличение значений $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$. Медианное время достижения $C_{\max}$ между дозами при многократном приеме ИП варьировалось от 0,5 ч до 2 ч. В параметрах $t_{1/2}$, MRT , Cl и V_d закономерностей, связанных с увеличением суточной дозы, не выявлено. Средние значения V_d после многократного приема ИП находились в диапазоне от 442,07 л до 996,54 л. Средний клиренс составил 23,71–28,54 л/ч, указывая на более медленное выведение препарата из плазмы при многократном дозировании. Среднее значение MRT возросло по сравнению с однократным дозированием, отражая накопление препарата при многократном применении [93].

При однократном приеме ИП 90% ДИ коэффициента β параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ находились в интервалах дозовой пропорциональности, то есть в исследуемом диапазоне доз установлена дозовая пропорциональность основных фармакокинетических параметров. При многократном приеме ИП 90% ДИ коэффициента β параметров $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ находились в интервалах дозовой пропорциональности, то есть в исследуемом диапазоне доз установлена дозовая пропорциональность ФК параметров для $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ [93].

3.4 Практическое применение разработанной методики – исследование фармакокинетики этмабена

Разработанная и валидированная методика количественного определения этмабена в плазме крови человека была применена при изучении концентраций этмабена в образцах добровольцев в рамках клинического исследования препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) [110]. Был проведен анализ 1680 образцов от 48 рандомизированных добровольцев, принимающих участие в исследовании по протоколу № СРНУ-MLA-01-2022 [110]. Пример хроматограммы добровольца, участвующего в данном исследовании, спустя 3 ч после однократного приема этмабена в дозе 1200 мг представлен на рисунке 25.

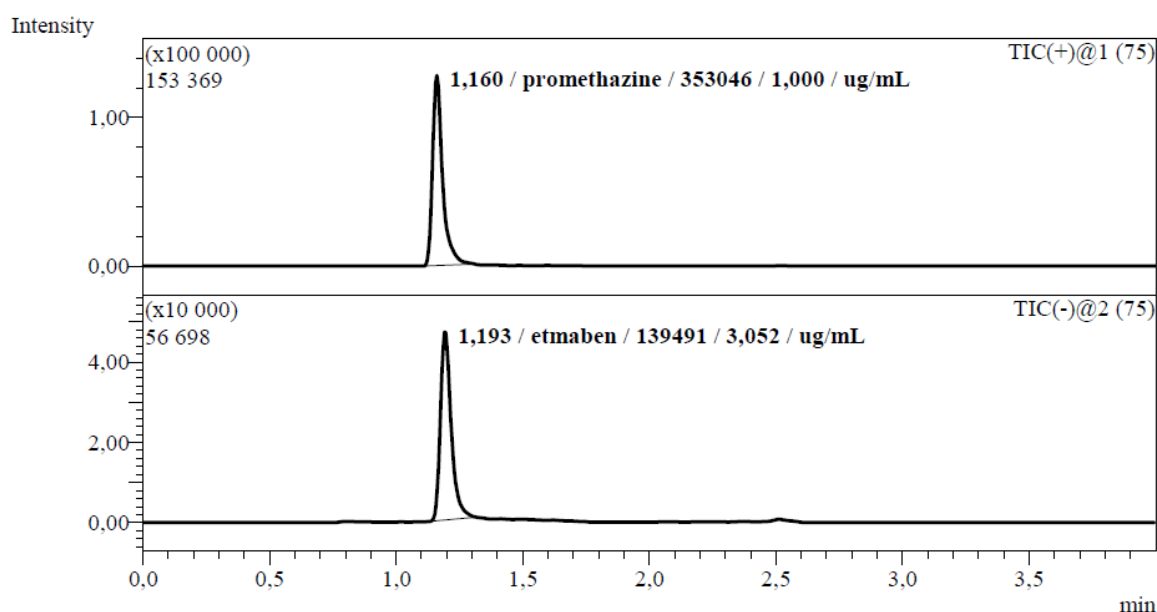


Рисунок 25 – Пример хроматограммы добровольца спустя 3 ч после однократного приема этмабена в дозе 1200 мг (первый сектор TIC(+))@1 хроматограммы – детекция прометазина; второй сектор TIC(-))@2 хроматограммы – детекция этмабена)

Всего было проведен анализ 17 аналитических циклов. В каждый аналитический цикл помимо образцов от добровольцев входили калибровочные образцы, холостые образцы, нулевой калибровочных образец, а также образцы контроля качества. Результаты оценки калибровочных образцов в каждом цикле

укладывались в требования нормативной документации (для не менее 75% калибровочных образцов не менее 6 уровней Е, % в пределах от -20% до +20% на уровне НПКО, в пределах от -15% до +15% – для остальных точек) [122-124]. Значение RSD для не менее 67% образцов контроля качества не менее чем в двух повторностях укладывались в 15% [122-124]. Для каждого значения концентраций образцов контроля качества значения Е укладывались в диапазон от -15% до +15 %, значения RSD укладывались в 15% [122-124]. Полученные данные представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Оценка правильности и прецизионности для образцов контроля качества между аналитическими циклами № 1–17 для этмабена

№ цикла	Найденная концентрация этмабена, мкг/мл										
	L*	L**	M1*	M1**	M2*	M2**	M3*	M3**	M4**	H*	H**
	0,750	0,120	1,500	0,175	4,500	1,750	18,000	5,250	21,000	24,000	28,000
1	0,838	–	1,714	–	4,976	–	19,247	–	–	20,446	–
	0,858	–	1,650	–	4,953	–	20,114	–	–	20,756	–
2	0,820	–	1,663	–	4,943	–	19,447	–	–	25,551	–
	0,816	–	1,723	–	4,974	–	19,257	–	–	23,454	–
3	0,862	–	1,719	–	5,080	–	19,844	–	–	23,030	–
	0,822	–	1,628	–	5,048	–	18,636	–	–	22,493	–
4	0,823	–	1,619	–	4,324	–	19,277	–	–	24,647	–
	0,791	–	1,699	–	5,117	–	20,594	–	–	26,460	–
5	0,805	–	1,317	–	4,572	–	15,594	–	–	20,665	–
	0,820	–	1,453	–	4,039	–	16,683	–	–	21,131	–
6	0,853	–	1,641	–	4,649	–	17,150	–	–	26,211	–
	0,826	–	1,574	–	4,821	–	20,148	–	–	27,161	–
7	0,816	–	1,715	–	4,811	–	20,339	–	–	25,868	–
	0,847	–	1,674	–	4,722	–	19,846	–	–	23,050	–
8	0,845	–	1,695	–	4,933	–	19,883	–	–	26,894	–
	0,813	–	1,686	–	4,778	–	18,483	–	–	25,702	–
9	0,809	–	1,658	–	4,192	–	18,667	–	–	23,128	–
	0,819	–	1,605	–	4,190	–	18,718	–	–	25,368	–
	0,855	–	1,664	–	4,670	–	18,478	–	–	23,648	–

Продолжение Таблицы 35

10	0,710	–	1,718	–	4,730	–	18,062	–	–	21,585	–
	0,692	–	1,708	–	5,137	–	17,942	–	–	20,770	–
	0,693	–	1,685	–	4,895	–	17,938	–	–	22,339	–
11	–	0,122	–	0,187	–	1,927	–	5,596	21,980	–	27,592
	–	0,127	–	0,180	–	1,856	–	5,461	23,224	–	29,743
	–	0,121	–	0,151	–	1,824	–	5,404	21,596	–	26,599
13	–	0,129	–	0,175	–	1,985	–	5,688	18,969	–	24,370
	–	0,137	–	0,175	–	1,995	–	5,842	19,121	–	24,551
	–	0,111	–	0,168	–	1,863	–	5,338	19,784	–	25,701
14	–	0,111	–	0,189	–	1,946	–	5,111	20,905	–	29,572
	–	0,132	–	0,177	–	1,992	–	5,579	22,125	–	31,251
15	–	0,123	–	0,189	–	1,987	–	5,828	23,507	–	31,657
	–	0,135	–	0,199	–	1,891	–	5,316	23,072	–	28,484
16	–	0,122	–	0,183	–	1,948	–	5,778	23,606	–	26,388
	–	0,135	–	0,196	–	1,849	–	5,410	20,723	–	28,750
	–	0,116	–	0,184	–	1,884	–	5,480	23,331	–	27,022
17	–	0,125	–	0,201	–	1,920	–	5,913	23,470	–	27,197
	–	0,121	–	0,198	–	1,871	–	5,653	21,421	–	27,068
Среднее значение	0,811	0,124	1,646	0,183	4,752	1,916	18,834	5,560	21,789	23,653	27,730
RSD, %	6,09	6,79	5,82	7,26	6,63	3,02	6,68	4,09	7,41	9,43	7,87
E, %	8,08	3,72	9,72	4,84	5,61	9,48	4,63	5,90	3,76	-1,45	-0,97

Примечание. *Уровень контроля качества, использовавшийся в циклах № 1–10. ** Уровень контроля качества, использовавшийся в циклах № 11–17.

С целью определения качества полученных данных был проведен повторный выборочный анализ 140 образцов для определения сопоставимости результатов первого и повторного анализов. Относительная погрешность результатов анализов не превышала 20% не менее чем для 82,86% проб, что соответствует критериям приемлемости (не менее 67% проб с погрешностью не более 20%) и подтверждает воспроизводимость результатов. На основании концентраций, полученных при

анализе образцов плазмы крови добровольцев после однократного и многократного приема исследуемого препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) были изучены фармакокинетические параметры препарата этмабена при однократном и многократном режимах дозирования, а также проведена оценка дозовой пропорциональности [110].

3.4.1 Исследование фармакокинетики этмабена при однократном дозировании

Результаты оценки фармакокинетических параметров этмабена при однократном применении исследуемого препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) представлены в таблице 36. Для всех параметров, кроме $T_{\max}$, приведены значения $\text{Mean} \pm \text{SD}$ [n] (Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра $T_{\max}$ приведены значения Median ($\text{Min} - \text{Max}$) [n] (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение, n – размер выборки) [110].

Таблица 36 – Сводная таблица фармакокинетических параметров этмабена после однократного приема натошак исследуемого препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в дозах 600 мг, 900 мг и 1200 мг

Доза, когорта ФК параметр	600 мг, когорта 1	900 мг, когорта 2	1200 мг, когорта 3
$C_{\max}$, мкг/мл	11,359 $\pm$ 4,666 [8]	16,020 $\pm$ 6,899 [8]	19,871 $\pm$ 4,415 [8]
$T_{\max}$, ч	0,5 (0,5-0,75) [8]	0,5 (0,5-1,5) [8]	0,5 (0,5-0,5) [8]
$AUC_{(0-t)}$, мкг·ч/л	14,545 $\pm$ 4,779 [8]	20,104 $\pm$ 8,664 [8]	23,469 $\pm$ 6,809 [8]
$AUC_{(0-\infty)}$, мкг·ч/л	15,141 $\pm$ 4,809 [8]	20,559 $\pm$ 8,656 [8]	24,168 $\pm$ 6,789 [8]
k_{el} , ч ⁻¹	0,952 $\pm$ 0,148 [8]	0,987 $\pm$ 0,125 [8]	0,898 $\pm$ 0,107 [8]
$T_{1/2}$, ч	0,746 $\pm$ 0,129 [8]	0,713 $\pm$ 0,098 [8]	0,781 $\pm$ 0,090 [8]
MRT , ч	1,527 $\pm$ 0,272 [8]	1,365 $\pm$ 0,198 [8]	1,300 $\pm$ 0,149 [8]
V_d , л	46,221 $\pm$ 15,818 [8]	50,079 $\pm$ 16,130 [8]	59,214 $\pm$ 15,531 [8]
Cl , л/ч	42,602 $\pm$ 10,954 [8]	50,113 $\pm$ 18,217 [8]	52,808 $\pm$ 13,302 [8]

Усредненные фармакокинетические профили в линейных координатах значений концентраций этмабена при однократном применении ИП в различных дозах приведены на рисунке 26.

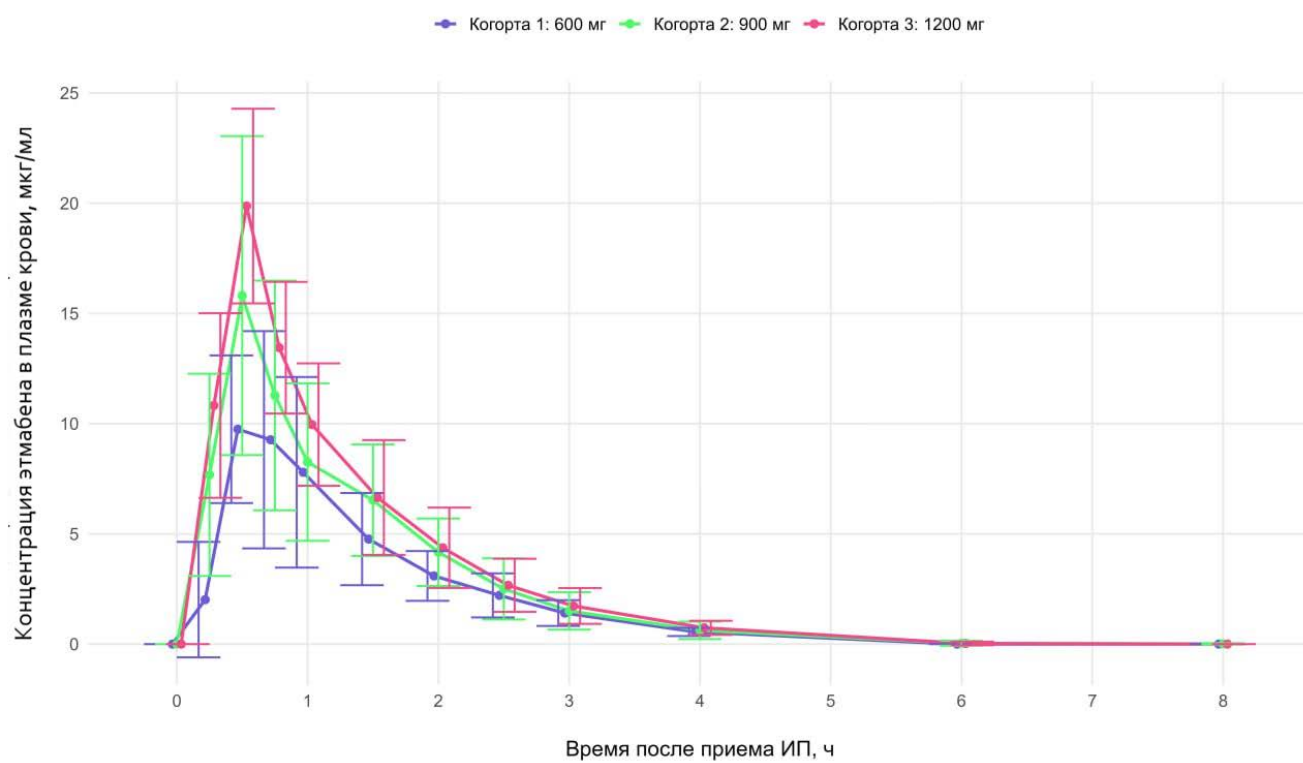


Рисунок 26 – Усредненные фармакокинетические профили в линейных координатах этмабена после однократного приема препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

На рисунке 27 представлены индивидуальные значения основных ФК параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями и аппроксимацией степенной функцией для когорт 1–3 при однократном дозировании ИП.

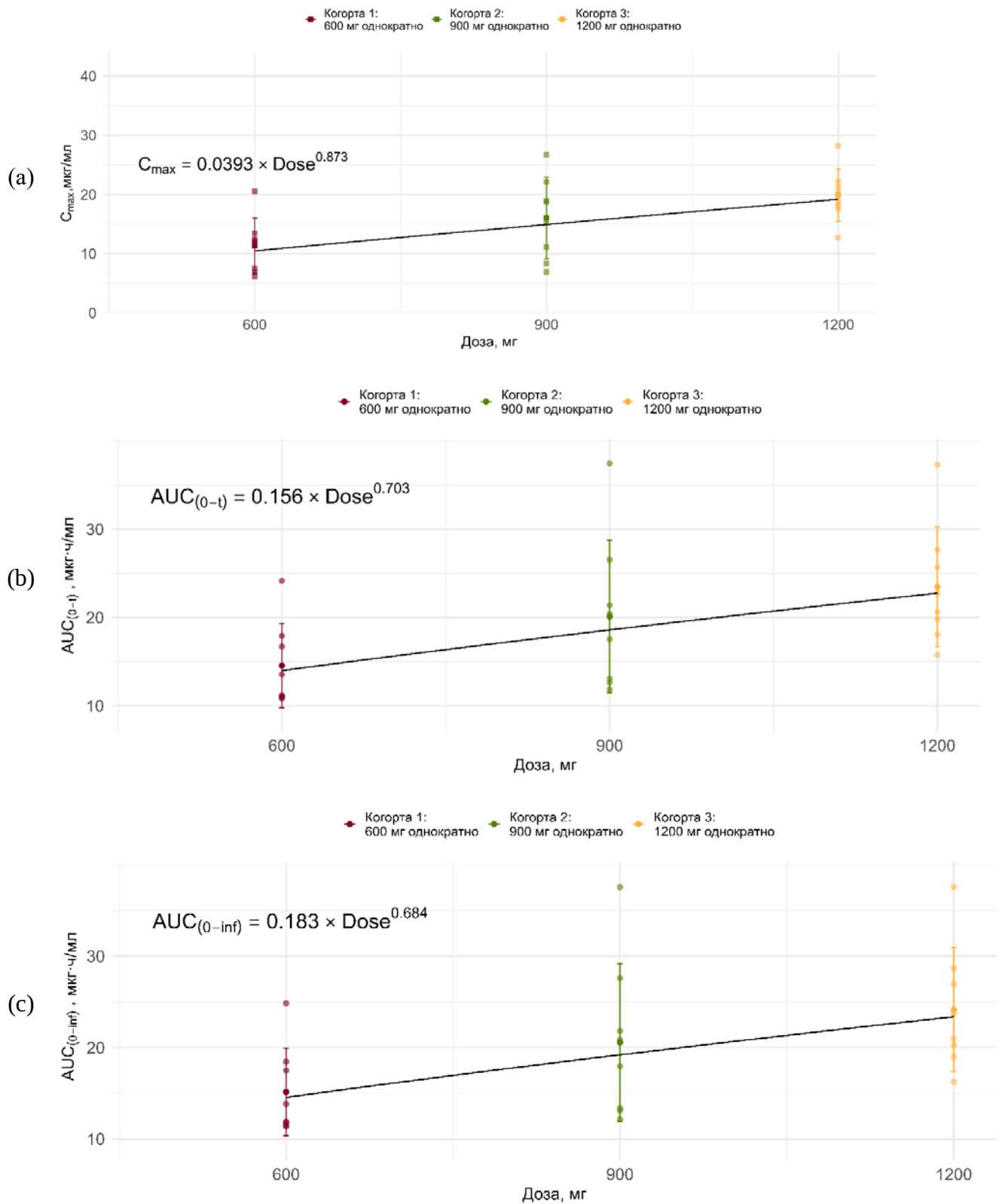


Рисунок 27 – Индивидуальные значения параметров $C_{\max}$ (а), $AUC_{(0-t)}$ (б), $AUC_{(0-\infty)}$ (с) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями при однократном приеме препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

На рисунке 28 представлены индивидуальные значения дополнительных фармакокинетических параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями для когорт 1–3 после однократного дозирования исследуемого препарата.

В таблице 37 приведены результаты оценки дозовой пропорциональности основных ФК параметров после однократного дозирования исследуемого препарата. При однократном приеме ИП значения коэффициента β для $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$, рассчитанные с помощью степенной модели после логарифмического преобразования, составили 0,873 (90% ДИ: 0,409–1,338), 0,703 (90% ДИ: 0,307–1,099) и 0,684 (90% ДИ: 0,297–1,071) соответственно.

Таблица 37 – Оценка дозовой пропорциональности этмабена на основе степенной модели

Режим дозирования	Параметр	β (Mean $\pm$ SE)	90% ДИ	Границы признания дозовой пропорциональности
Однократное дозирование (когорты 1–3)	$C_{\max}$	0,873 $\pm$ 0,270	0,409–1,338	[0,00; 2,00]
	$AUC_{(0-t)}$	0,703 $\pm$ 0,231	0,307–1,099	
	$AUC_{(0-\infty)}$	0,684 $\pm$ 0,225	0,297–1,071	

Примечание. β – коэффициент дозовой пропорциональности; Mean – среднее арифметическое; SE – стандартная ошибка; CI – доверительный интервал. Границы признания дозовой пропорциональности рассчитаны по формуле $[1 + \frac{\ln(Q_L)}{\ln(R)}; 1 + \frac{\ln(Q_U)}{\ln(R)}]$, где R – отношение наибольшей и наименьшей изучаемых доз (R= 2); Q_L – нижняя граница ($Q_L = 0,5$); Q_U – верхняя граница ($Q_U = 2,0$) [129].

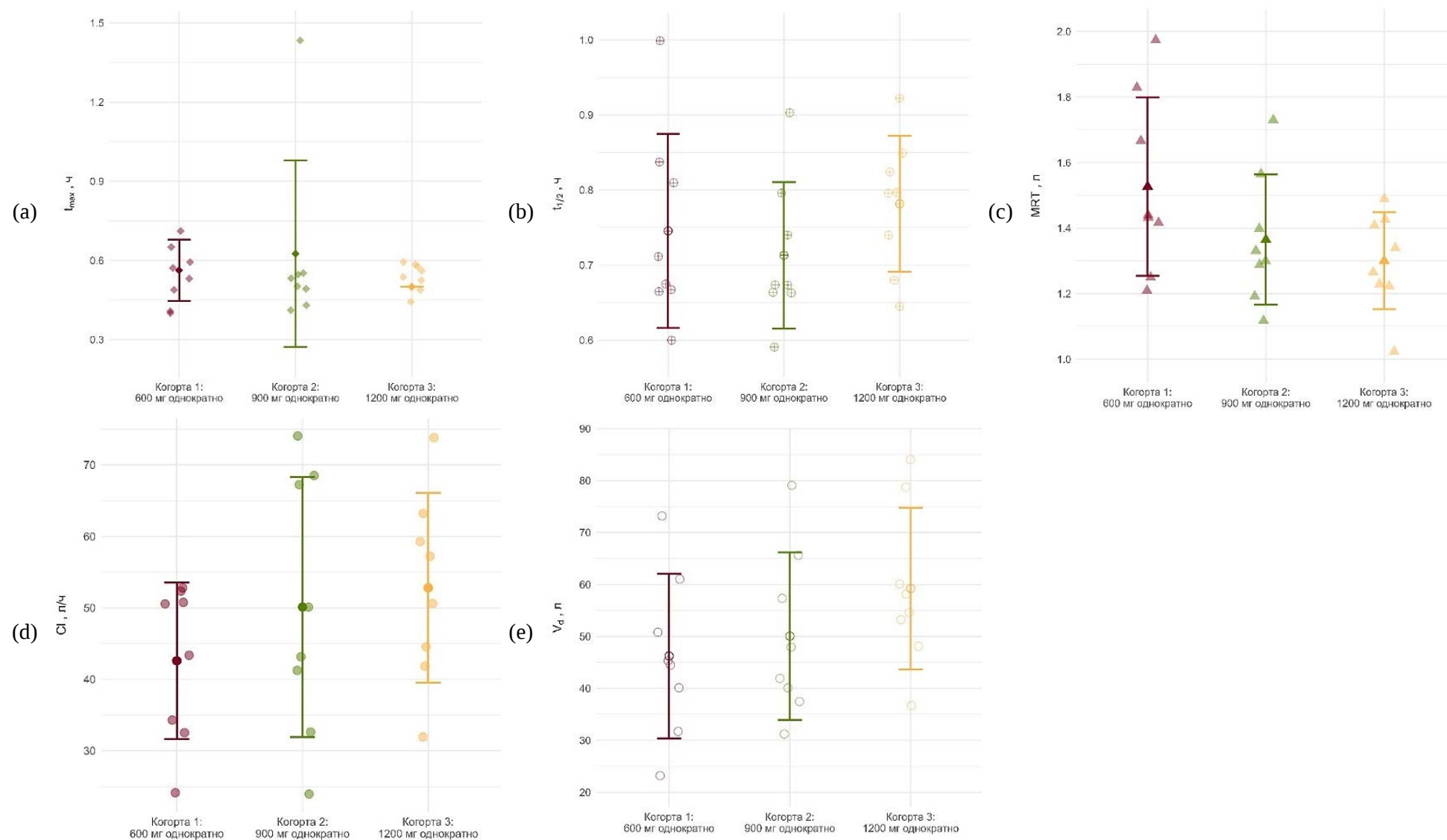
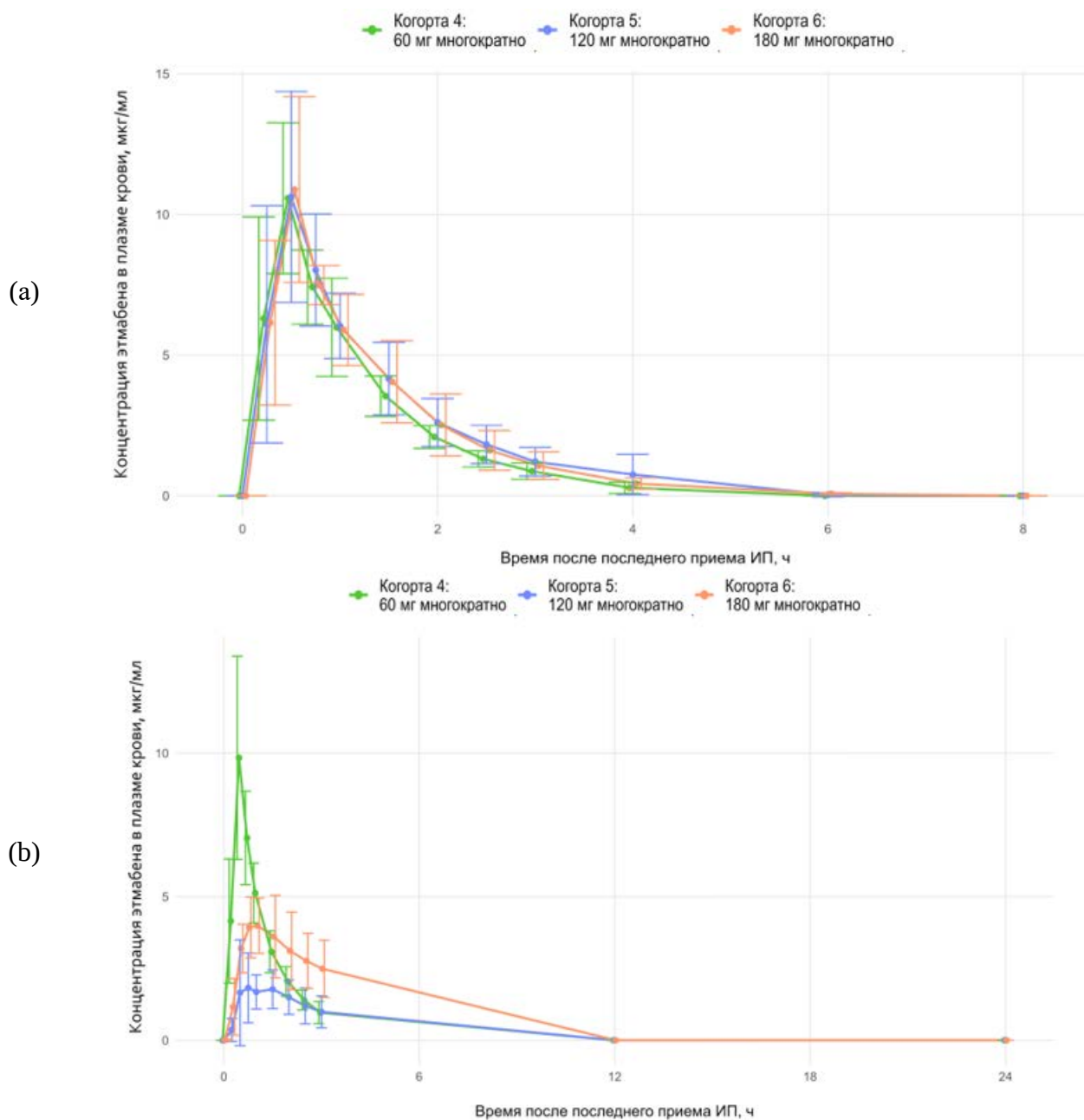


Рисунок 28 – Индивидуальные значения фармакокинетических параметров t_{max} (a), $t_{1/2}$ (b), MRT (c), Cl (d), V_d (e) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями при однократном приеме препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России)

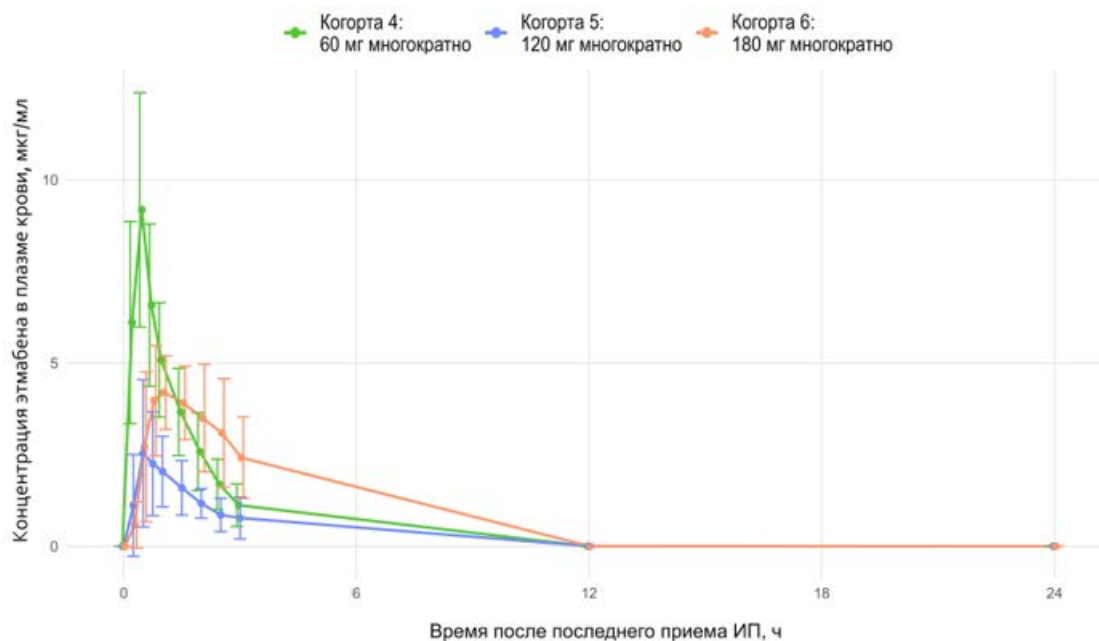
3.4.2 Исследование фармакокинетики этмабена при многократном дозировании

Результаты оценки фармакокинетических параметров этмабена при многократном применении исследуемого препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) представлены в таблице 38.

Усредненные фармакокинетические профили в линейных координатах значений концентраций этмабена при многократном применении ИП в различных дозах в день 1, день 2, день 5 и день 7 приведены на рисунке 29.



(с)



(d)

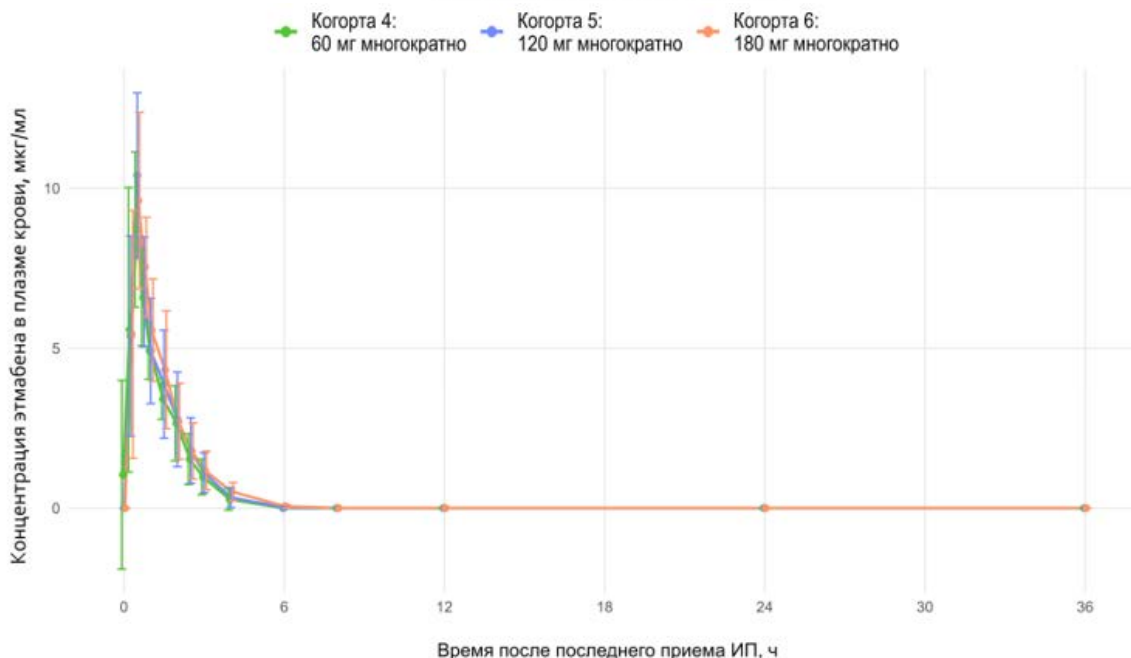


Рисунок 29 – Усредненные фармакокинетические профили в линейных координатах этмабена после многократного приема препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в течение 7 дней (а – день 1, b – день 3, с – день 5, d – день 7)

На рисунке 30 представлены индивидуальные значения основных ФК параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями и аппроксимацией степенной функцией для когорт 4–6 после многократного дозирования ИП в день 7.

Таблица 38 – Сводная таблица фармакокинетических параметров этмабена после многократного приема натошак исследуемого препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в дозах 600 мг, 900 мг и 1200 мг в день 1, день 3, день 5 и день 7

ФК параметр	600 мг, когорта 4				900 мг, когорта 5				1200 мг, когорта 6			
	День 1	День 3	День 5	День 7	День 1	День 3	День 5	День 7	День 1	День 3	День 5	День 7
$C_{\max}$, мкг/мл	10,930 ± 2,602 [8]	10,005 ± 3,439 [8]	9,818 ± 3,034 [8]	9,194 ± 3,305 [8]	11,002 ± 3,109 [8]	2,708 ± 1,461 [8]	3,279 ± 1,498 [8]	10,406 ± 2,580 [8]	11,284 ± 2,609 [8]	4,572 ± 1,226 [8]	5,241 ± 1,061 [8]	10,247 ± 2,204 [8]
$T_{\max}$, ч	0,5 (0,25-1) [8]	0,5 (0,5- 0,75) [8]	0,5 (0,25- 0,75) [8]	0,5 (0,25- 0,5) [8]	0,5 (0,5- 0,75) [8]	1,5 (0,5- 2,5) [8]	0,625 (0,5- 3) [8]	0,5 (0,5- 0,5) [8]	0,5 (0,5- 0,75) [8]	0,875 (0,5- 2,5) [8]	1 (0,5-2,5) [8]	0,5 (0,5- 1,5) [8]
$AUC_{(0-t)}$, мкг·ч/л	12,509 ± 2,344 [8]	N/A	N/A	11,708 ± 2,079 [8]	14,483 ± 2,994 [8]	N/A	N/A	12,787 ± 3,205 [8]	14,011 ± 2,308 [8]	N/A	N/A	13,757 ± 3,130 [8]
$AUC_{(0-\infty)}$, мкг·ч/л	12,970 ± 2,369 [8]	N/A	N/A	12,259 ± 2,241 [8]	14,940 ± 2,982 [8]	N/A	N/A	13,159 ± 3,120 [8]	14,090 ± 2,336 [8]	N/A	N/A	13,911 ± 3,080 [8]
$AUC_{(0-\tau)}$, мкг·ч/мл	N/A	10,683 ± 1,674 [8]	11,624 ± 2,444 [8]	N/A	N/A	4,075 ± 0,765 [8]	4,854 ± 1,160 [8]	N/A	N/A	8,937 ± 1,913 [8]	9,247 ± 2,048 [8]	N/A
k_{el} , ч ⁻¹	0,964 ± 0,123 [8]	N/A	N/A	1,053 ± 0,149 [8]	0,832 ± 0,167 [8]	N/A	N/A	1,043 ± 0,209 [8]	0,964 ± 0,245 [8]	N/A	N/A	0,960 ± 0,093 [8]
$T_{1/2}$, ч	0,730 ± 0,097 [8]	N/A	N/A	0,672 ± 0,111 [8]	0,874 ± 0,236 [8]	N/A	N/A	0,698 ± 0,198 [8]	0,748 ± 0,131 [8]	N/A	N/A	0,729 ± 0,074 [8]
MRT, ч	1,254 ± 0,169 [8]	N/A	N/A	1,330 ± 0,296 [8]	1,474 ± 0,347 [8]	N/A	N/A	1,357 ± 0,282 [8]	1,393 ± 0,363 [8]	N/A	N/A	1,399 ± 0,255 [8]

Примечание. Для всех параметров, кроме $T_{\max}$, приведены значения Mean ± SD [n] (Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра $T_{\max}$ приведены значения Median (Min – Max) [n] (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение, n – размер выборки). N/A – не применимо.

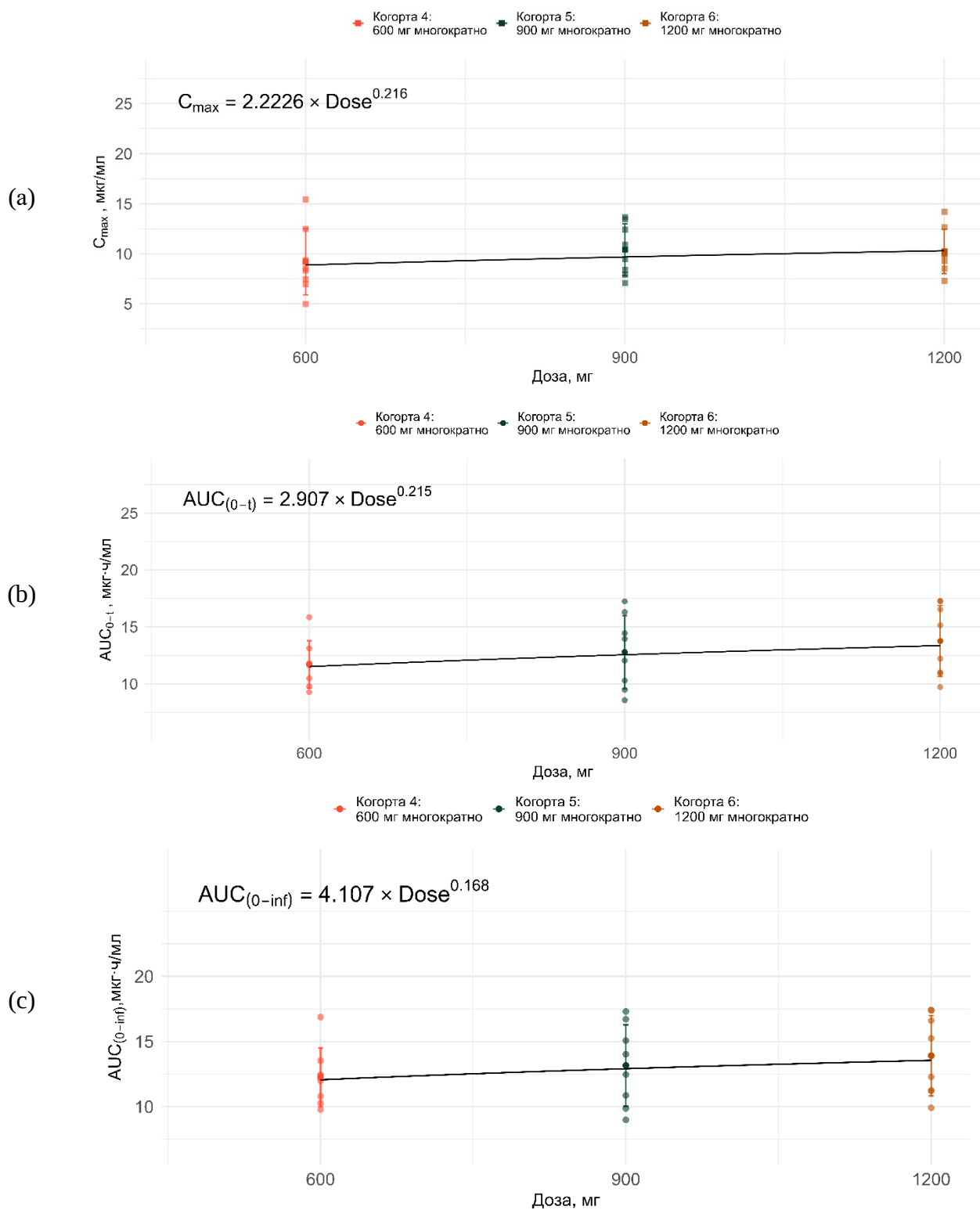


Рисунок 30 – Индивидуальные значения фармакокинетических параметров $C_{\max}$ (а), $AUC_{(0-t)}$ (б), $AUC_{(0-\infty)}$ (в) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями после многократного приема препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в день 7

На рисунке 31 представлены индивидуальные значения дополнительных фармакокинетических параметров с соответствующими средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями для когорт 4–6 после многократного дозирования ИП в день 7.

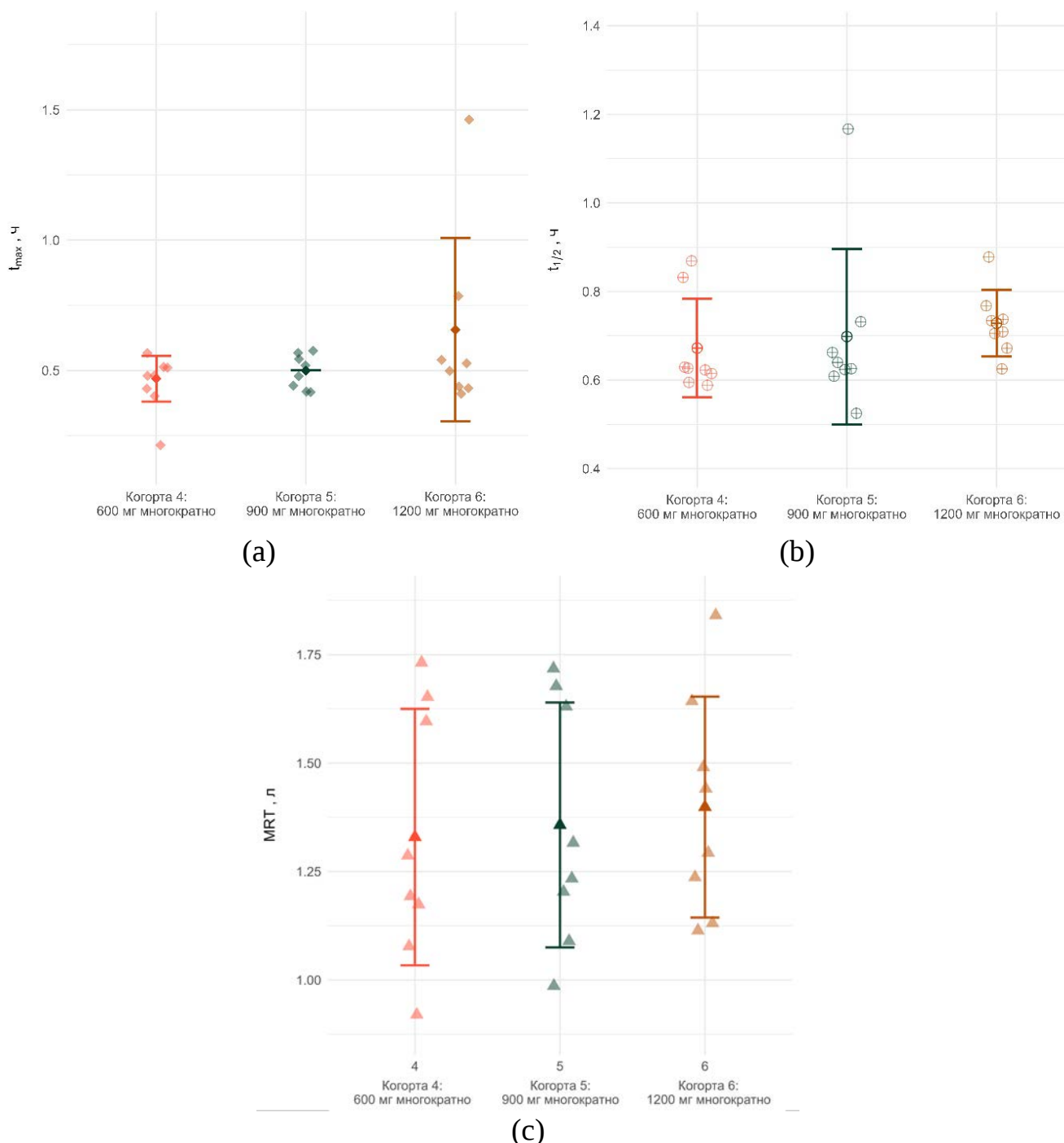


Рисунок 31 – Индивидуальные значения фармакокинетических параметров t_{max} (a), $t_{1/2}$ (b), MRT (c) со средними арифметическими значениями и стандартными отклонениями после многократного приема препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в день 7

В таблице 39 приведены результаты оценки дозовой пропорциональности основных ФК параметров после однократного дозирования исследуемого препарата «Этмабен». При однократном приеме ИП значения коэффициента β для $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$, рассчитанные с помощью степенной модели после логарифмического преобразования, составили 0,216 (90% ДИ: -0,119–0,552), 0,215 (90% ДИ: -0,542–0,484) и 0,168 (90% ДИ: -0,09–0,429) соответственно.

Таблица 39 – Оценка дозовой пропорциональности этмабена после многократного дозирования в день 7 на основе степенной модели

Режим дозирования	Параметр	β (Mean $\pm$ SE)	90% ДИ	Границы признания дозовой пропорциональности
Многократное дозирование (когорты 4–6)	$C_{\max}$	0,216 $\pm$ 0,195	-0,119–0,552	[0,00; 2,00]
	$AUC_{(0-t)}$	0,215 $\pm$ 0,157	-0,542–0,484	
	$AUC_{(0-\infty)}$	0,168 $\pm$ 0,152	-0,09–0,429	

Примечание. β – коэффициент дозовой пропорциональности; Mean – среднее арифметическое; SE – стандартная ошибка; CI – доверительный интервал. Границы признания дозовой пропорциональности рассчитаны по формуле $[1 + \frac{\ln(Q_L)}{\ln(R)}; 1 + \frac{\ln(Q_U)}{\ln(R)}]$, где R – отношение наибольшей и наименьшей изучаемых доз (R= 2); Q_L – нижняя граница ($Q_L = 0,5$); Q_U – верхняя граница ($Q_U = 2,0$) [129].

3.4.3 Обсуждение полученных результатов

В исследовании фармакокинетики этмабена у добровольцев при пероральном приеме препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) натошак в дозах 600 мг, 900 мг и 1200 мг было установлено, что при однократном режиме дозирования с эскалацией дозы препарата наблюдалось увеличение значений $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$. Препарат быстро абсорбируется из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток: $T_{\max}$ достигалась в течение 0,5 ч [110].

Как при однократном, так и при многократном режимах дозирования среднее значение $T_{1/2}$ составляло менее 1 ч, что указывает на высокую скорость выведения препарата из организма. Невысокие значения площадей под кривыми

«концентрация – время» (AUC), немного превышающие $C_{\max}$, свидетельствуют о том, что общее количество доступного этмабена на протяжении времени ограничено. При однократном применении среднее значение объема распределения V_d составляет более 45 л, что свидетельствует о способности этмабена легко проникать в ткани. Однако высокий общий клиренс подтверждает, что этмабен быстро удаляется из плазмы, что в сочетании с коротким периодом полувыведения также может указывать на небольшую продолжительность его действия [110].

Среднее время удерживания лекарственного вещества в плазме (MRT) является важным фармакокинетическим параметром, отражающим среднюю продолжительность времени, в течение которого вещество находится в организме до элиминации. MRT составило не более $1,527 \pm 0,272$ ч, с учетом высокой скорости выведения, это также указывает на кратковременное действие препарата [110].

При многократном дозировании с эскалацией дозы в день 3 и день 5 наблюдалось снижение $C_{\max}$ и небольшое увеличение $T_{\max}$, что, в сочетании с низкими значениями $AUC_{(0-t)}$, свидетельствует об отсутствии кумуляции этмабена [110].

При однократном приеме ИП 90% ДИ коэффициента β параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ находились в интервалах дозовой пропорциональности, то есть в исследуемом диапазоне доз установлена дозовая пропорциональность основных фармакокинетических параметров. При многократном приеме ИП 90% ДИ коэффициента β параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ выходили за интервалы дозовой пропорциональности, то есть в исследуемом диапазоне доз дозовая пропорциональность основных фармакокинетических параметров при многократном дозировании в день 7 не установлена [110].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Разработана методика количественного определения малобена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС: подобраны условия масс-

спектрометрического детектирования малобена и ВС прометазина, определены оптимальные условия хроматографического разделения веществ, включая условия пробоподготовки, а также выбран аналитический диапазон методики в условиях отсутствия литературных данных об ожидаемых значениях $C_{\max}$ малобена в плазме крови.

2. Проведена полная валидация методики количественного определения малобена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС в соответствии с требованиями актуальной нормативной документации. Результаты оценки валидационных параметров подтвердили пригодность данной методики для количественного определения малобена в плазме человека в рамках проведения биоаналитических исследований. Была подтверждена селективность методики. Методика продемонстрировала линейность, правильность и прецизионность в рамках диапазона 0,75–150,00 нг/мл. Выбранный способ пробоподготовки продемонстрировал воспроизводимое извлечение определяемых веществ из плазмы. Было подтверждено отсутствие влияния на результаты анализа компонентов матрицы. Было доказано отсутствие эффекта переноса пробы, а также оценена стабильность.

3. Разработанная и валидированная методика определения малобена в плазме человека была применена при проведении анализа образцов от добровольцев в рамках клинического исследования I фазы препарата малобена. По результатам, полученным при анализе образцов от добровольцев, впервые были изучены фармакокинетические параметры малобена у человека при однократном и многократном применении исследуемого препарата малобена, построены усредненные фармакокинетические профили, а также оценена дозовая пропорциональность.

4. Разработана отдельная методика количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС: разработаны параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования. С помощью «оценочного» подхода выбран аналитический диапазон для этмабена.

5. Проведена полная валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В рамках полной валидации был валидирован диапазон 0,250–30,000 мкг/мл для этмабена в плазме крови. В процессе исследования потребовалось провести частичную валидацию методики и расширить аналитический диапазон методики. Частичная валидация была проведена в рамках диапазона 0,040–35,000 мкг/мл. Методика соответствовала всем требованиям нормативной документации.

6. Разработанная и валидированная методика определения этмабена в плазме человека была применена при проведении анализа образцов от добровольцев в рамках I фазы КИ препарата этмабена. По результатам, полученным при анализе образцов от добровольцев, впервые были изучены фармакокинетические параметры этмабена у человека при однократном и многократном применении исследуемого препарата этмабена, построены усредненные фармакокинетические профили, а также изучена дозовая пропорциональность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые разработана биоаналитическая методика количественного определения малобена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика отличается высокой чувствительностью с нижним пределом количественного определения 0,75 нг/мл, отличается коротким временем анализа пробы (составляющим 4 минуты), имеет нетрудоемкий способ пробоподготовки (осаждением ацетонитрилом) и доступный внутренний стандарт (прометазин). Проведена полная валидация данной методики в соответствии с требованиями решения №85 Совета ЕЭК, а также в соответствии с рекомендациями FDA и ЕМА по параметрам линейность, правильность и прецизионность (внутри циклов и между циклами), нижний предел количественного определения, селективность, пригодность СО, матричный эффект, степень извлечения, перенос пробы, стабильность. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,75–150,00 нг/мл для малобен в плазме крови. Все валидационные параметры соответствовали критериям приемлемости, что позволяет использовать ее при проведении аналитической части исследования препаратов малобена.

2. Разработанная и валидированная методика использована при проведении количественного определения малобена в 864 образцах плазмы крови 24 здоровых добровольцев, включенных в клиническое исследование фазы I лекарственного препарата на основе малобена. Методика была успешно апробирована в аналитическом этапе исследования в ходе анализа 7 аналитических циклов и продемонстрировала высокий процент воспроизводимости данных, оцененный в ходе повторного выборочного анализа с результатом 85,45%. На основе определенных концентраций малобена в плазме крови добровольцев оценены основные ($C_{\max}$, $t_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$) и дополнительные ($t_{1/2}$, k_{el} , MRT , V_d , Cl) фармакокинетические параметры малобена в рамках клинического исследования фазы I лекарственного препарата «Малобен», таблетки, 60 мг (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). С увеличением дозы от 60 до 180 мг при однократном приеме исследуемого препарата наблюдалось увеличение как значения $C_{\max}$ (от $18,09 \pm 8,06$ нг/мл до $51,81 \pm 11,05$ нг/мл), так и общей экспозиции

$AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ (от $348,59 \pm 200,65$ нг·ч/л и $623,05 \pm 390,08$ нг·ч/л до $1177,13 \pm 221,81$ нг·ч/л и $1666,93 \pm 596,25$ нг·ч/л соответственно). Медианные значения t_{max} сокращались с увеличением дозы при однократном приеме от 6 ч до 0,5 ч. После многократного приема исследуемого препарата в течение 7 дней в суточных дозах от 60 до 180 мг также отмечалось увеличение значений C_{max} (от $37,93 \pm 20,98$ нг/мл до $78,98 \pm 37,03$ нг/мл), $AUC_{(0-t)}$ (от $3142,22 \pm 2091,08$ нг·ч/л до $7799,02 \pm 3829,67$ нг·ч/л) и $AUC_{(0-\infty)}$ (от $3228,41 \pm 2141,08$ нг·ч/л до $8970,72 \pm 5143,42$ нг·ч/л). Медианное время достижения C_{max} между дозами при многократном приеме ИП варьировалось от 0,5 ч до 2 ч. При однократном приеме установлена дозовая пропорциональность основных фармакокинетических параметров C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$. При многократном приеме в исследуемом диапазоне доз установлена дозовая пропорциональность только для $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$. Возможно применение данной методики в рамках фармакокинетических исследований на последующих фазах клинических исследований препарата малобена, полученные в ходе данного исследования данные о фармакокинетике малобена позволяют перейти к следующим этапам КИ препарата малобена на пациентах.

3. Разработана биоаналитическая методика количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Данная методика характеризуется коротким временем анализа пробы (4 минуты), широким аналитическим диапазоном (от 0,040 мкг/мл до 35,000 мкг/мл) и использованием нетрудоемкого способа пробоподготовки (осаждения ацетонитрилом), что позволяет использовать ее для анализа большого количества образцов. Проведена валидация данной методики в соответствии с действующими регуляторными требованиями (Решение №85 Совета ЕЭК, руководства FDA и EMA). В рамках полной валидации были оценены линейность в диапазоне 0,250–30,000 мкг/мл, правильность, прецизионность, нижний предел количественного определения, селективность, пригодность СО, матричный эффект, степень извлечения, перенос пробы, стабильность. В рамках полной валидации был валидирован для этмабена в плазме крови. В рамках частичной валидации в связи необходимости в расширении аналитического диапазона были оценены следующие параметры: линейность в

диапазоне 0,040–35,000 мкг/мл, правильность, прецизионность, нижний предел количественного определения, селективность.

4. Разработанная и валидированная ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения этмабена в образцах плазмы крови здоровых добровольцев была успешно апробирована при анализе 1680 образцов плазмы крови от 48 рандомизированных добровольцев в рамках 17 аналитических циклов. Данная методика может быть использована на последующих этапах КИ препарата этмабена. На основе определенных концентраций этмабена в плазме крови добровольцев оценены основные и дополнительные фармакокинетические параметры этмабена в рамках фазы I клинического исследования лекарственного препарата этмабена. С увеличением дозы от 600 до 1200 мг при однократном приеме исследуемого препарата наблюдалось увеличение значения $C_{\max}$ (от $11,359 \pm 4,666$ мкг/мл до $19,871 \pm 4,415$ мкг/мл), $AUC_{(0-t)}$ (от $14,545 \pm 4,779$ мкг·ч/л до $23,469 \pm 6,809$ мкг·ч/л) и $AUC_{(0-\infty)}$ (от $15,141 \pm 4,809$ мкг·ч/л до $24,168 \pm 6,789$ мкг·ч/л). Препарат быстро абсорбируется в системный кровоток, медианное значение $T_{\max}$ при однократном приеме исследуемого препарата достигалась в течение 0,5 ч. Как при однократном, так и при многократном режимах дозирования среднее значение $T_{1/2}$ составляло менее 1 ч, что указывает на высокую скорость выведения препарата из организма. При многократном дозировании с эскалацией дозы наблюдалось снижение $C_{\max}$ и небольшое увеличение $T_{\max}$, что, в сочетании с низкими значениями $AUC_{(0-t)}$, свидетельствует об отсутствии кумуляции этмабена. При однократном приеме препарата «Этмабен» в исследуемом диапазоне доз установлена дозовая пропорциональность основных фармакокинетических параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$. При многократном приеме препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) дозовая пропорциональность основных фармакокинетических параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ при многократном дозировании в день 7 не установлена. Полученные фармакокинетические данные позволяют перейти к следующим этапам КИ на пациентах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФС	– активная фармацевтическая субстанция
ВПКО	– верхний предел количественного определения
ВС	– внутренний стандарт
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ВЭЖХ-МС/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ВЭЖХ-УФ	– высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием
ГЛФ	– готовая лекарственная форма
ДИ	– доверительный интервал
ДКИ	– доклиническое исследование
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЭС	– Евразийский экономический союз
ЖК	– жирные кислоты
ИБС	– ишемическая болезнь сердца
ИП	– исследуемый препарат
КИ	– клиническое исследование
К ₃ ЭДТА	– трикалиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
МАЗБП	– метаболически-ассоциированная жировая болезнь печени
МК	– малоновая кислота
МС	– метаболический синдром
НПКО	– нижний предел количественного определения
ПМК	– производное малоновой кислоты
СД-2	– сахарный диабет 2 типа
СИ	– степень извлечения

СО	– стандартный образец
СПХФУ	– Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет
ССЗ	– сердечно-сосудистые заболевания
ФК	– фармакокинетический
ФНО- α	– фактор некроза опухоли-альфа
$AUC_{(0-\infty)}$	– площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» от момента приема исследуемого препарата до бесконечности
$AUC_{(0-t)}$	– площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» от момента приема исследуемого препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t
CE	– энергия соударения (от англ. collision energy)
Cl	– клиренс
$C_{\max}$	– максимальная концентрация
E	– относительная погрешность
ESI	– электроспрей-ионизация (от англ. electrospray ionization)
H	– верхний уровень
k_{el}	– константа скорости терминальной элиминации
L	– нижний уровень
LLOQ	– нижний предел количественного определения (от англ. Lower Limit of Quantification)
M1, M2, M3, M4	– средний уровень
M_f	– матричный фактор
MRM	– мониторинг множественных реакций (от англ. Multiple Reaction Monitoring)
MRT	– среднее время удерживания препарата в организме (от англ. Mean Residence Time)

Q1	– первый квадруполь
Q3	– третий квадруполь
RSD	– относительное стандартное отклонение (от англ. Relative Standard Deviation)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheemerla, S. Global epidemiology of chronic liver disease / S. Cheemerla, M. Balakrishnan // *Clinical Liver Disease*. – 2021. – Vol. 17, № 5. – P. 365–370. – DOI: 10.1002/cld.1061.
2. Cotter, T. G. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease / T. G. Cotter, M. Rinella // *Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 158, № 7. – P. 1851–1864. – DOI: 10.1053/j.gastro.2020.01.052.
3. Radu, F. The link between NAFLD and metabolic syndrome / F. Radu, C. G. Potcovaru, T. Salmen [et al.] // *Diagnostics*. – 2023. – Vol. 13, № 4. – P. 614. – DOI: 10.3390/diagnostics13040614.
4. Powell, E. E. Non-alcoholic fatty liver disease / E. E. Powell, V. W. Wong, M. Rinella // *The Lancet*. – 2021. – Vol. 397, № 10290. – P. 2212–2224. – DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32511-3.
5. Moon, A. M. Contemporary epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis / A. M. Moon, A. G. Singal, E. B. Tapper // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2020. – Vol. 18, № 12. – P. 2650–2666. – DOI: 10.1016/j.cgh.2019.07.060.
6. Paternostro, R. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease / R. Paternostro, M. Trauner // *Journal of Internal Medicine*. – 2022. – Vol. 292, № 2. – P. 190–204. – DOI: 10.1111/joim.13531.
7. Chandrasekaran, P. The role of obesity in type 2 diabetes mellitus – An overview / P. Chandrasekaran, R. Weiskirchen // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 3. – P. 1882. – DOI: 10.3390/ijms25031882.
8. Teng, M. L. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease / M. L. Teng, C. H. Ng, D. Q. Huang [et al.] // *Clinical and Molecular Hepatology*. – 2023. – Vol. 29, Suppl. – P. S32–S42. – DOI: 10.3350/cmh.2022.0365.
9. Белых, М. А. Влияние 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия на проявления экспериментального неалкогольного стеатогепатита / М. А. Белых // *Биомедицина*. – 2021. – Т. 17, № 3. – С. 95–99. – DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-95-99.

10. Буракова, Л. Н. Влияние фактора питания на развитие метаболического синдрома / Л. Н. Буракова, М. В. Николенко, М. Н. Школьников [и др.] // Ползуновский вестник. – 2024. – № 3. – С. 82–89. – DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2024.03.012.
11. Mitrovic, B. Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: where do we stand today? / B. Mitrovic, Z. M. Gluvic, M. Obradovic [et al.] // Archives of Medical Science. – 2022. – Vol. 19, № 4. – P. 884–294. – DOI: 10.5114/aoms/150639.
12. Концевая, А. В. Экономика профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации / А. В. Концевая, Д. К. Муканеева, В. И. Игнатьева [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2023. – Т. 28, № 9. – С. 5521. – DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5521.
13. Campbell, N. R. WHO HEARTS: a global program to reduce cardiovascular disease burden: experience implementing in the Americas and opportunities in Canada / N. R. Campbell, P. Ordunez, G. Giraldo [et al.] // Canadian Journal of Cardiology. – 2021. – Vol. 37, № 5. – P. 744–755. – DOI: 10.1016/j.cjca.2020.12.004.
14. Movsisyan, N. K. Cardiovascular diseases in central and eastern Europe: a call for more surveillance and evidence-based health promotion / N. K. Movsisyan, M. Vinciguerra, J. R. Medina-Inojosa, F. Lopez-Jimenez // Annals of Global Health. – 2020. – Vol. 86, № 1. – P. 21. – DOI: 10.5334/aogh.2713.
15. Şahin, B. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries / B. Şahin, G. İlğün // Health & Social Care in the Community. – 2022. – Vol. 30, № 1. – P. 73–80. – DOI: 10.1111/hsc.13156.
16. Nasarian, E. Association between work-related features and coronary artery disease: A heterogeneous hybrid feature selection integrated with balancing approach / E. Nasarian, M. Abdar, M. A. Fahami [et al.] // Pattern Recognition Letters. – 2020. – Vol. 133. – P. 33–40. – DOI: 10.1016/j.patrec.2020.02.010.
17. Rehman, S. Cardiovascular disease (CVD): assessment, prediction and policy implications / S. Rehman, E. Rehman, M. Ikram, Z. Jianglin // BMC Public Health. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 1382. – DOI: 10.1186/s12889-021-11450-z.

18. Timmis, A. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2019 / A. Timmis, N. Townsend, C. P. Gale [et al.] // *European Heart Journal*. – 2020. – Vol. 41, № 1. – P. 12–85. – DOI: 10.1093/eurheartj/ehz859.
19. Roth, G. A. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study / G. A. Roth, G. A. Mensah, C. O. Johnson [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2020. – Vol. 76, № 25. – P. 2982–3021. – DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
20. Сизова, Ж. М. Фармакотерапевтические подходы к лечению стабильной стенокардии: трудные вопросы – простые решения / Ж. М. Сизова // *Медицинский совет*. – 2021. – № 4. – С. 34–40. – DOI: 10.21518/2079-701X-2021-4-34-40.
21. Ковансков, В. Е. Оценка влияния производных малоновой кислоты на выживаемость мышей в условиях гипоксии / В. Е. Ковансков, В. И. Кушнир, С. А. Булатова // 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: СПХФУ, 2022. – С. 342–345.
22. Стаценко М. Е. Миокардиальная цитопротекция при ишемической болезни сердца: что мы знаем об этом с позиции доказательной медицины? / М. Е. Стаценко, С. В. Туркина, С. В. Фабрицкая, Л. В. Полетаева // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2011. – № 2 (38). – С. 9–14.
23. Хабибулина М. М. Влияние метаболической терапии на состояние церебральной гемодинамики при гипоэстрогенемии / М. М. Хабибулина, М. Д. Шамилов // *Врач*. – 2023. – Т. 34, № 3. – С. 52–56. – DOI: 10.29296/25877305-2023-03-10.
24. Авенирова, Е. Л. Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства / Е. Л. Авенирова, П. А. Алексеева, Н. И. Баранова [и др.] // *Биомедицина*. – 2014. – № 1. – С. 4–10.

25. Карнакова, П. К. Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13, № 1. – С. 257–271. – DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752.

26. Ивкин, Д. Ю. Скрининговая оценка гепатотропного действия, характерного для малобена и этмабена / Д. Ю. Ивкин, А. Ю. Гришина, А. Р. Муслимов // От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов II Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 23 сентября 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 32–35.

27. Оковитый, С. В. Антистеатозное средство: пат. 2702003 Рос. Федерация / С. В. Оковитый, Д. Ю. Ивкин, Н. А. Анисимова [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. – № 2018136198; заявл. 12.10.2018; опубл. 18.03.2019, Бюл. № 8. – 9 с. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2702003C1/ru> (дата обращения: 15.01.2026).

28. Бажанова, Е. Д. Влияние 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия и метформина на динамику апоптоза и пролиферации гепатоцитов у мышей с сахарным диабетом и ожирением / Е. Д. Бажанова, С. В. Оковитый, М. А. Белых // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 5. – С. 17–20. – DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-17-20.

29. Белых, М. А. Влияние нового производного малоновой кислоты на массу жировой ткани мышей C57BL/6 при экспериментальном стеатозе / М. А. Белых, А. А. Булыгина, В. А. Виноградова // Инновации в здоровье нации: сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 8–9 ноября 2017 года. – Санкт-Петербург: СПХФА, 2017. – С. 112–116.

30. Ивкин, Д. Ю. Основные фармакологические и токсикологические характеристики малобена / Д. Ю. Ивкин, А. Ю. Гришина // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов II Всероссийской научной

конференции, Санкт-Петербург, 23 сентября 2024 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2024. – С. 36–38.

31. Кириллова, Н. В. Влияние малобена на содержание общих липидов и гликогена в печени и мышцах при экспериментальном стеатозе печени / Н. В. Кириллова, О. М. Спасенкова, А. О. Ли // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 3 декабря 2020 года. – Санкт-Петербург: СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2020. – С. 91–93.

32. Ивкин, Д. Ю. Сравнение возможных фармакологических эффектов инновационных препаратов производных малоновой кислоты - этмабена и малобена / Д. Ю. Ивкин, А. Ю. Гришина, Е. К. Красова // От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов II Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 23 сентября 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 29-31.

33. Анисимова, Н. А. Изучение гипогликемизирующей активности комбинаций малобена с синтетическими противодиабетическими препаратами на стрептозоциновой модели сахарного диабета / Н. А. Анисимова, А. О. Ежова // Биомедицина. – 2024. – Т. 20, № S3. – С. 151–155. – DOI: 10.33647/2713-0428-20-3E-151-155.

34. Ли, А. О. Влияние экспериментального вещества малобена на перекисное окисление липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты при экспериментальной гипергликемии / А. О. Ли, О. М. Спасенкова, Н. В. Кириллова, Н. А. Анисимова // Современные достижения фармацевтической науки и практики: сборник материалов международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета, Витебск, 31 октября 2019 года. – Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2019. – С. 19–21.

35. Ежова, А. О. Изучение гипогликемической активности 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия на модели адреналиновой гипергликемии / А.

О. Ежова // Молодая фармация – потенциал будущего: Итоги конкурсной программы научных работ XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием. Сборник материалов конференции, Санкт-Петербург, 01 марта – 11 марта 2023 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 89–93.

36. Гришина, А. Ю. Изучение эффектов длительного применения этмабена при хронической сердечной недостаточности / А. Ю. Гришина, А. А. Карпов, Д. Ю. Ивкин // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов II Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 23 сентября 2024 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2024. – С. 20–21.

37. Гришина, А. Ю. Применение 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) для терапии амилоидоза сердца / А. Ю. Гришина, Е. М. Евгеньева, Д. Ю. Ивкин // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов II Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 23 сентября 2024 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2024. – С. 22–25.

38. Ивкин, Д. Ю. Влияние производного бензойной кислоты на формирование экспериментальной хронической сердечной недостаточности / Д. Ю. Ивкин, А. А. Карпов, А. В. Драчева [и др.] // Фармация. – 2016. – Т. 63, № 4. – С. 49–52.

39. Ивкин, Д. Ю. Сравнительный анализ фармакологических свойств этмабена и эмпаглифлозина / Д. Ю. Ивкин, А. С. Ивкина // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов III Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 17 ноября 2025 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2025. – С. 39–41.

40. Ивкин, Д. Ю. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием / Д. Ю. Ивкин, А. А. Карпов // Биомедицина. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 109–112. – DOI 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.

41. Ивкин, Д. Ю. Экспериментальная оценка фармакологической безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием / Д. Ю. Ивкин, А. А. Карпов, В. Е. Ковансков, И. А. Титович // Биомедицина. – 2023. – Т. 19, № 3Е. – С. 95–98. – DOI 10.33647/2713-0428-19-3Е-95-98.
42. Роль производных малоновой кислоты в модуляции метаболических путей в почках при хронической сердечной недостаточности / А. Ю. Гришина, Д. Ю. Ивкин, А. А. Карпов [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 4. – С. 270–279. – DOI 10.33380/2305-2066-2025-14-4-2227.
43. Сравнительная эффективность фармакотерапии хронической сердечной недостаточности в эксперименте / Д. Ю. Ивкин, А. Б. Зеленцова, М. В. Краснова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 349–357. – DOI 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998.
44. Сравнительная эффективность этмабена и эмпаглифлозина в моно- и комбинированной терапии экспериментальной хронической сердечной недостаточности / Д. Ю. Ивкин, М. В. Краснова, Е. Д. Семивеличенко [и др.] // Биомедицина. – 2024. – Т. 20, № 3Е. – С. 187–190. – DOI 10.33647/2713-0428-20-3Е-187-190.
45. Ruderman, N. B. Malonyl CoA as a metabolic switch and a regulator of insulin sensitivity / N. B. Ruderman, A. K. Saha, D. Vavvas [et al.] // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1998. – Vol. 441. – P. 263–270. – DOI: 10.1007/978-1-4899-1928-1_24.
46. Ruderman, N. B. Malonyl CoA, long chain fatty acyl CoA and insulin resistance in skeletal muscle / N. B. Ruderman, D. Dean // Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. – 1998. – Vol. 9, № 2-4. – P. 295–308. – DOI: 10.1515/jbcpp.1998.9.2-4.295.
47. Saha, A. K. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership / A. K. Saha, N. B. Ruderman // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2003. – Vol. 253, № 1-2. – P. 65–70. – DOI: 10.1023/a:1026053302036.

48. Chien, D. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo / D. Chien, D. Dean, A. K. Saha [et al.] // *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. – 2000. – Vol. 279, № 2. – P. E259–E265. – DOI: 10.1152/ajpendo.2000.279.2.E259.
49. Bowman, C. E. Role of the malonyl-CoA synthetase ACSF3 in mitochondrial metabolism / C. E. Bowman, M. J. Wolfgang // *Advances in Biological Regulation*. – 2019. – Vol. 71. – P. 34–40. – DOI: 10.1016/j.jbior.2018.09.002.
50. Wang, Y. Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases / Y. Wang, W. Yu, S. Li [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 836058. – DOI: 10.3389/fonc.2022.836058.
51. Асташкин, Е. И. Фармакологическая регуляция обмена энергетических субстратов в кардиомиоцитах при патологических состояниях, связанных с ишемией / Е. И. Асташкин, М. Г. Глезер // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2006. – Т. 5, № 7. – С. 112–123.
52. Saggerson, D. Malonyl-CoA, a Key Signaling Molecule in Mammalian Cells / D. Saggerson // *Annual Review of Nutrition*. – 2008. – Vol. 28, № 1. – P. 253–272. – DOI: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155434.
53. Joly, E. Malonyl-CoA decarboxylase is present in the cytosolic, mitochondrial and peroxisomal compartments of rat hepatocytes / E. Joly, M. Bendayan, R. Roduit [et al.] // *FEBS Letters*. – 2005. – Vol. 579, № 29. – P. 6581–6586. – DOI: 10.1016/j.febslet.2005.10.050.
54. Witkowski, A. Mammalian ACSF3 protein is a malonyl-CoA synthetase that supplies the chain extender units for mitochondrial fatty acid synthesis / A. Witkowski, J. Thweatt, S. Smith // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, № 39. – P. 33729–33736. – DOI: 10.1074/jbc.M111.291591.
55. Foster, D. W. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation / D. W. Foster // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122, № 6. – P. 1958–1959. – DOI: 10.1172/JCI63967.
56. Honda, A. Highly sensitive quantification of serum malonate, a possible marker for de novo lipogenesis, by LC-ESI-MS/MS / A. Honda, K. Yamashita, T.

Ikegami [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2009. – Vol. 50, № 10. – P. 2124–2130. – DOI: 10.1194/jlr.D800054-JLR200.

57. Schreurs, M. Regulatory enzymes of mitochondrial β -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome / M. Schreurs, F. Kuipers, F. R. van der Leij // Obesity Reviews. – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 380–388. – DOI: 10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x.

58. Wang, H. Cardiac metabolism, reprogramming, and diseases / H. Wang, M. Shen, X. Shu [et al.] // Journal of Cardiovascular Translational Research. – 2024. – Vol. 17, № 1. – P. 71–84. – DOI: 10.1007/s12265-023-10432-3.

59. Ngo, J. Mitochondrial morphology controls fatty acid utilization by changing CPT1 sensitivity to malonyl-CoA / J. Ngo, D. W. Choi, I. A. Stanley [et al.] // The EMBO Journal. – 2023. – Vol. 42. – DOI: 10.15252/embj.2022111901.

60. Deja, S. Hepatic malonyl-CoA synthesis restrains gluconeogenesis by suppressing fat oxidation, pyruvate carboxylation, and amino acid availability / S. Deja, I. C. Fuentes, R. C. Brown [et al.] // Cell Metabolism. – 2024. – Vol. 36, № 5. – P. 1088–1104. e12. – DOI: 10.1016/j.cmet.2024.02.004.

61. Aparicio, D. Structural asymmetry and disulfide bridges among subunits modulate the activity of human malonyl-CoA decarboxylase / D. Aparicio, R. Pérez-Luque, X. Carpena [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288, № 17. – P. 11907–11919. – DOI: 10.1074/jbc.M112.443846.

62. Михин, В. П. Роль цитопротекторов в лечении пациентов с хроническими формами ишемической болезни сердца / В. П. Михин, Т. А. Николенко, Н. И. Громнацкий // Терапия. – 2021. – Т. 7, № 4. – С. 132–139. – DOI: 10.18565/therapy.2021.4.132-139.

63. Yassine, C. Адипокины: механизмы метаболических и поведенческих расстройств / C. Yassine, M. Aloulou, D. Ben Sallem [et al.] // Ожирение и метаболизм. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 14–20. – DOI: 10.14341/OMET9430.

64. Tokushige, K. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020 / K. Tokushige, K. Ikejima, M. Ono

[et al.] // Journal of Gastroenterology. – 2021. – Vol. 56, № 11. – P. 951–963. – DOI: 10.1007/s00535-021-01796-x.

65. Tincopa, M. A. Non-invasive diagnosis and monitoring of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis / M. A. Tincopa, R. Loomba // The Lancet Gastroenterology & Hepatology. – 2023. – Vol. 8, № 7. – P. 660–670. – DOI: 10.1016/S2468-1253(23)00066-3.

66. Petrelli, F. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis: HCC and Steatosis or Steatohepatitis / F. Petrelli, M. Manara, S. Colombo [et al.] // Neoplasia. – 2022. – Vol. 30. – P. 100809. – DOI: 10.1016/j.neo.2022.100809.

67. Targher, G. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications / G. Targher, C. D. Byrne, H. Tilg // Gut. – 2020. – Vol. 69, № 9. – P. 1691–1705. – DOI: 10.1136/gutjnl-2020-320622.

68. Targher, G. NAFLD, and cardiovascular and cardiac diseases: Factors influencing risk, prediction and treatment / G. Targher, K. E. Corey, C. D. Byrne // Diabetes & Metabolism. – 2021. – Vol. 47, № 2. – P. 101215. – DOI: 10.1016/j.diabet.2020.101215.

69. Карелина, Л. Н. Влияние малоновой кислоты на качество мяса и активность сукцинатдегидрогеназы у цыплят-бройлеров при темновом стрессе / Л. Н. Карелина, Б. Я. Власов, О. П. Ильина // Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География. – 2011. – № 4.

70. Yang, Y. Succinate dehydrogenase inhibitor dimethyl malonate alleviates LPS/d-galactosamine-induced acute hepatic damage in mice / Y. Yang, R. Shao, L. Tang [et al.] // Innate Immunity. – 2019. – Vol. 25, № 8. – P. 522–529. – DOI: 10.1177/1753425919873042.

71. Jin, Y. Dimethyl malonate preserves brain and neurobehavioral phenotype following neonatal hypoxia-ischemia by inhibiting FTH1-mediated ferritinophagy / Y. Jin, X. Wang, X. Xu [et al.] // Redox Biology. – 2025. – Vol. 86. – P. 103792. – DOI: 10.1016/j.redox.2025.103792.

72. Доровских, В. А. Антиокислительная активность производных малоновой кислоты / В. А. Доровских, Е. В. Зражевская, Е. А. Бородин, Г. П. Бородина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1992. – Т. 55, № 3. – С. 34–37.
73. Borole, K. D. Curative effects of malotilate on ethanol-induced hepatic dysfunction in rats / K. D. Borole, S. L. Bodhankar // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2016. – Vol. 7, № 11. – P. 4501–4509. – DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(11).4501-09.
74. Niwano, Y. Acceleration of liver regeneration by malotilate in partially hepatectomized rats / Y. Niwano, M. Katoh, M. Uchida, T. Sugimoto // Japanese Journal of Pharmacology. – 1986. – Vol. 40, № 3. – P. 411–415. – DOI: 10.1254/jjp.40.411.
75. Bae J. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration / J. Bae, R. J. Salamon, E. B. Brandt [et al.] // Circulation. – 2021. – Vol. 143, № 20. – P. 1973–1986. – DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049952.
76. Wang S. Mitochondria-derived methylmalonic acid, a surrogate biomarker of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, predicts all-cause and cardiovascular mortality in the general population / S. Wang, Y. Liu, J. Liu [et al.] // Redox Biology. – 2020. – Vol. 37. – P. 101741. – DOI: 10.1016/j.redox.2020.101741.
77. Prag H. A. Ester prodrugs of malonate with enhanced intracellular delivery protect against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo / H. A. Prag, L. Pala, D. Kula-Alwar [et al.] // Cardiovascular Drugs and Therapy. – 2022. – Vol. 36. – P. 1–13. – DOI: 10.1007/s10557-020-07033-6.
78. Prag H. A. Ischemia-selective cardioprotection by malonate for ischemia/reperfusion injury / H. A. Prag, D. Aksentijevic, A. Dannhorn [et al.] // Circulation Research. – 2022. – Vol. 131, № 6. – P. 528–541. – DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320717.
79. Канорский, С. Г. Неалкогольная жировая болезнь печени: современные подходы к диагностике и лечению / С. Г. Канорский // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2021. – Т. 2, № 3. – С. 18–29. – DOI: 10.21886/2712-8156-2021-2-3-18-29.

80. Lim, S. Links between metabolic syndrome and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease / S. Lim, J. W. Kim, G. Targher // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2021. – Vol. 32, № 7. – P. 500–514. – DOI: 10.1016/j.tem.2021.04.008.

81. Киселева, Е. В. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет 2 типа: проблема сопряженности и этапности развития / Е. В. Киселева, Т. Ю. Демидова // *Ожирение и метаболизм*. – 2021. – Т. 18, № 3. – С. 313–319. – DOI: 10.14341/omet12758.

82. Targher, G. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus – mechanisms and treatments / G. Targher, K. E. Corey, C. D. Byrne, M. Roden // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. – 2021. – Vol. 18. – P. 599–612. – DOI: 10.1038/s41575-021-00448-y.

83. Петунина, Н. А. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет 2-го типа: общие подходы к выбору терапии / Н. А. Петунина, М. Э. Тельнова, Е. В. Гончарова [и др.] // *Терапевтический архив*. – 2022. – Т. 94, № 10. – С. 1155–1162. – DOI: 10.26442/00403660.2022.10.201921.

84. Пат. 1787030 СССР, МПК А61К 31/19. Вещество с антиоксидантной активностью / В. А. Доровских, Е. А. Бородин, Е. В. Зражевская; заявитель и патентообладатель Благовещенский государственный медицинский институт. – № 4882694/14; заявл. 16.11.1990; опубл. 07.01.1993, Бюл. № 1.

85. Пат. 1773234 СССР, МПК А61К 31/19. Средство, обладающее антиалкогольным действием / В. А. Доровских, Н. Р. Левченко, С. Н. Тарасенко; заявитель и патентообладатель Благовещенский государственный медицинский институт. – № 4883496/14; заявл. 20.11.1990; опубл. 30.10.1992, Бюл. № 40.

86. Юсковец, В. Н. Способ получения 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия: пат. 2624729 Рос. Федерация / В. Н. Юсковец, Н. М. Чернов, И. П. Яковлев, И. А. Наркевич; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. – № 2016102446; заявл. 26.01.2016; опубл. 04.07.2017, Бюл. № 19. – 10 с. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2624729C1/ru> (дата обращения: 15.11.2024).

87. Елецкая, Е. И. Исследование фармакокинетических параметров 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия (Малобен) / Е. И. Елецкая, Е. Д. Семивеличенко, Н. Ю. Сипкина // От молекулы до лекарственного препарата : Сборник материалов I Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года / Все материалы публикуются в авторской редакции. – Санкт-Петербург: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2023. – С. 12–16.

88. Елецкая, Е. И. Изучение токсикологического профиля 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия (малобен) / Е. И. Елецкая, Е. Д. Семивеличенко // От молекулы до лекарственного препарата : Сборник материалов I Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года / Все материалы публикуются в авторской редакции. – Санкт-Петербург: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2023. – С. 17-22.

89. Влияние экспериментального вещества малобена на показатели углеводного обмена при экспериментальном сахарном диабете / О. М. Спасенкова, А. О. Ли, Н. В. Кириллова, Е. А. Нечаева // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: Сборник научных трудов 3-й международной конференции, посвященной 110-летию доктора биологических наук, профессора А. П. Бресткина, Санкт-Петербург, 01–02 декабря 2022 года. Том Часть 1. – Санкт-Петербург: Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, 2022. – С. 317-323.

90. Ежова, А. О. Изучение гипогликемической активности комбинаций малобена с синтетическими противодиабетическими препаратами на моделях перорального глюкозотолерантного теста, инсулинового теста толерантности и адреналиновой гипергликемии / А. О. Ежова // Молодая фармация – потенциал

будущего: Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 28 марта – 02 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 423-426.

91. Оценка влияния 4,4''-(пропандиамидо)дibenзоата натрия на физическую работоспособность мышцей с экспериментальным стеатозом печени / С. В. Радько, Ю. Д. Болотина, М. А. Поверяева, М. А. Белых // Инновации в здоровье нации: Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 08–09 ноября 2017 года. – Санкт-Петербург: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2017. – С. 29-32.

92. Применение метода электростимуляционного утомления для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия у мышцей db/db / В. А. Приходько, Т. М. Матузок, А. Ю. Гришина [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 332-348. – DOI 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997.

93. Изучение фармакокинетики препарата «Малобен» при однократном и многократном дозировании у добровольцев / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, Н. С. Багаева [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 4. – С. 280-294. – DOI 10.33380/2305-2066-2025-14-4-2228.

94. Крыжановский, С. А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α,ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов / С. А. Крыжановский, А. М. Лихошерстов, И. Б. Цорин [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – № 2. – С. 10–13.

95. Severino, P. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction / P. Severino, A. D'Amato, M. Pucci

[et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 21. – P. 8118. – DOI: 10.3390/ijms21218118.

96. Orellana-Urzúa, S. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress / S. Orellana-Urzúa, I. Rojas, L. Líbano, R. Rodrigo // Current Pharmaceutical Design. – 2020. – Vol. 26, № 34. – P. 4246–4260. – DOI: 10.2174/1381612826666200708133912.

97. Шабанов, П. Д. Профессор П.П. Денисенко и его школа: научная биография и личные воспоминания / П. Д. Шабанов // Психофармакология и биологическая наркология. – 2024. – Т. 15, № 4. – С. 337–346. DOI: 10.17816/phbn641857.

98. Юсковец, В. Н. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойной кислоты: пат. 2515245 Рос. Федерация / В. Н. Юсковец, И. П. Яковлев, И. А. Наркевич; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. – № 2013105369/04; заявл. 07.02.2013; опубл. 10.05.2014, Бюл. № 13.

99. Патент № 2167852 С1 Российская Федерация, МПК С07С 235/74, С07С 235/80. Способ получения этилового эфира 4-карбоксифениламида малоновой кислоты: № 2000117697/04; заявл. 04.07.2000; опубл. 27.05.2001 / В. А. Печенюк, П. П. Денисенко, А. Т. Кирсанов [и др.]; заявитель Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия.

100. Патент № 2545833 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/245, А61К 31/133, А61К 31/198. Фармацевтическая композиция с антиишемической и антиоксидантной активностью и способ ее получения: № 2013153648/15; заявл. 03.12.2013; опубл. 10.04.2015 / В. А. Вайнштейн, А. А. Теслев, В. В. Сорокин [и др.]; заявитель государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России).

101. Патент № 2602665 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/198, А61К 31/245, А61К 31/045. Способ получения водорастворимого лиофилизата 4-(3-оксо-

3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты, обладающей антиишемической и антиоксидантной активностью: № 2015124309/15: заявл. 22.06.2015: опубл. 20.11.2016 / В. А. Вайнштейн, А. А. Теслев, И. А. Наркевич, И. П. Яковлев; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России).

102. Гришина, А. Ю. Возможности фармакокоррекции этмабеном постренального острого повреждения почки / А. Ю. Гришина, Д. Ю. Ивкин // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов III Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 17 ноября 2025 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2025. – С. 32–35.

103. Гришина, А. Ю. Изучение алергизирующих свойств этмабена / А. Ю. Гришина, А. В. Караваева // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов I Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 52–54.

104. Гришина, А. Ю. Изучение распределения этмабена в почках и моче крыс: влияние острого повреждения почек на биокумуляцию / А. Ю. Гришина, В. В. Пажельцев, Д. Ю. Ивкин // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов II Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 23 сентября 2024 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2024. – С. 26–28.

105. Гришина, А. Ю. Изучение фармакокинетических параметров – 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) / А. Ю. Гришина, А. А. Карпов // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов I Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 58–61.

106. Гришина, А. Ю. Оценка антиоксидантной активности этмабена и мексидола на модели ишемии почки / А. Ю. Гришина, Е. В. Вишняков, Д. Ю. Ивкин // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов III

Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 17 ноября 2025 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2025. – С. 29–31.

107. Гришина, А. Ю. Оценка мутагенного потенциала производного малоновой кислоты этмабена / А. Ю. Гришина, Е. М. Евгеньева, Е. И. Елецкая // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов I Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 55–57.

108. Гришина, А. Ю. Сравнительная оценка эффективности производных малоновой кислоты с целью фармакологической защиты при тепловой ишемии почки / А. Ю. Гришина // Молодая фармация – потенциал будущего: сборник материалов XV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 07–08 апреля 2025 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2025. – С. 294–298.

109. Гришина, А. Ю. Сравнительный анализ нефропротективного потенциала этмабена и рамиприла в экспериментальных моделях обструктивной уropатии и ишемического повреждения почек / А. Ю. Гришина, Е. К. Красова, Д. Ю. Ивкин // От молекулы до лекарственного препарата: сборник материалов III Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 17 ноября 2025 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2025. – С. 36–38.

110. Карнакова, П. К. Изучение фармакокинетики производного малоновой кислоты этмабена в рамках I фазы клинического исследования / П. К. Карнакова, К. К. Карнакова, Т. Н. Комаров [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13, № 4. – С. 259–271. – DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965.

111. Генералова, Ю. Э. Определение чистоты новой фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия хроматографическими методами / Ю. Э. Генералова, В. Ф. Апраксин, Г. М. Алексеева // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – № 3(29). – С. 19-26. – DOI 10.34907/JRQAI.2020.49.35.001.

112. Генералова, Ю. Э. Оптимизация условий хроматографического определения примесей в фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия / Ю. Э. Генералова, Г. М. Алексеева // Современные достижения фармацевтической науки и практики: материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, 31 октября 2019 года / под редакцией А. Т. Щастного. – Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2019. – С. 186–189.

113. Новожихорева, В. О. Разработка и валидация методики количественного определения активной фармацевтической субстанции в новом лекарственном средстве методом ВЭЖХ / В. О. Новожихорева // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции им. проф. Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых, Томск, 21–24 мая 2018 г. – Томск: Томский политехнический университет, 2018. – С. 288–289.

114. Подходы к аттестации стандартного образца 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) / А. А. Адамова, П. А. Михайлова, А. Б. Зеленцова, Ю. Э. Генералова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2023. – № 1(39). – С. 4-13. – DOI 10.34907/JPQAI.2023.30.97.001.

115. Адамова, А. А. Количественное определение стандартного образца 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) методом материального баланса / А. А. Адамова // Молодая фармация – потенциал будущего: итоги конкурсной программы научных работ XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 1–11 марта 2023 года: сборник материалов конференции. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 163–166.

116. Генералова, Ю. Э. Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей / Ю. Э.

Генералова, И. И. Тернинко, А. Б. Зеленцова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 209–216. – DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.

117. Способ количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия в биологических объектах: пат. 2780870 Рос. Федерация / Н. Ю. Сипкина, Ю. Э. Генералова, И. П. Яковлев; заявитель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. – № 2021117809; заявл. 16.06.2021; опубл. 04.10.2022, Бюл. № 28. – 12 с.

118. Generalova, Y. Determination of related impurities in a new active pharmaceutical ingredient – Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate / Y. Generalova, N. Sipkina, G. Alekseeva // Microchemical Journal. – 2021. – Vol. 168. – P. 106498. – DOI: 10.1016/j.microc.2021.106498.

119. Способ определения родственных примесей в 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоате натрия с методом капиллярного электрофореза: пат. 2721908 Рос. Федерация / Ю. Э. Генералова, Г. М. Алексеева; заявитель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. – № 2020100508; заявл. 09.01.2020; опубл. 25.05.2020, Бюл. № 15. – 14 с.

120. Алексеева, Г. М. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции / Г. М. Алексеева, В. Ф. Апраксин, Ю. Э. Генералова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 66–71. – DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.

121. Карнакова, П. К. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения малобена в плазме человека методом хромато-масс-спектрометрии / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Е. С. Ветрова, М. О. Попова, И. И. Тернинко, Д. Ю. Ивкин, И. Е. Шохин, И. А. Наркевич // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2026. – Т. 29, № 5. – С. 113–124. – DOI: 10.29296/25877313-2026-05-12.

122. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского

экономического союза» [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456026107> (дата обращения: 13.02.2026).

123. Guideline on bioanalytical method validation // European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – 2012. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (Accessed: 13.02.2026)

124. Bioanalytical method validation. Guidance for Industry // U.S. Food and Drug Administration. – 2018. – URL: <https://www.fda.gov/media/70858/download> (Accessed: 13.02.2026).

125. Карнакова, П. К. Определение малобена в плазме крови человека с целью изучения фармакокинетики / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин // III Международная научно-практическая конференция, Томск, 18–20 сентября 2024 года: сборник материалов. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2024. – С. 250–252.

126. Карнакова, П. К. Проведение фармакокинетического исследования нового антистеатозного препарата малобена / П. К. Карнакова // Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 7 апреля 2025 года. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2025. – С. 313–316.

127. Карнакова, П. К. Исследования фармакокинетики препаратов малобена и этмабена – производных малоновой кислоты / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин // Актуальные проблемы и перспективы современной фармации: интеграция науки, образования и практики: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Владикавказ, 20 мая 2025 года. – Владикавказ: Северо-Осетинская государственная медицинская академия, 2025. – С. 118–123.

128. Smith, B. P. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality / B. P. Smith, F. R. Vandenhende, K. A. DeSante [et al.] // *Pharmaceutical Research*. – 2000. – Vol. 17, № 10. – P. 1278–1283. – DOI: 10.1023/a:1026451721686.

129. Hummel, J. Exploratory assessment of dose proportionality: review of current approaches and proposal for a practical criterion / J. Hummel, S. McKendrick, C. Brindley, R. French // *Pharmaceutical Statistics*. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 38–49. – DOI: 10.1002/pst.326.

130. Карнакова, П. К. Разработка методики количественного определения нового лекарственного препарата этмабен в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, М. О. Попова, И. Е. Шохин // *Перспективы развития биологии, медицины и фармации: сборник трудов X международной научной конференции молодых ученых и студентов, Шымкент, 2023 года*. – Шымкент: Южно-Казахстанская медицинская академия, 2023. – С. 103–105.

131. Карнакова, П. К. Особенности разработки ВЭЖХ-МС/МС-методики количественного определения этмабена в плазме крови человека для фармакокинетического исследования / П. К. Карнакова // *Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 28 марта – 02 апреля 2024 года*. – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2024. – С. 617–622.

132. Карнакова, П. К. Особенности разработки методики количественного определения малобена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров // *Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов- 2024», секция «Химия»*. – М.: Издательство «Перо», 2024. – С. 49.

133. Tan, A. Use of internal standards in LC-MS bioanalysis / A. Tan, K. Awaiye // *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations* / edited by Wenkui Li, Jie Zhang, Francis L. S. Tse. – Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. – P. 217–227.

134. Yao, L. A highly sensitive HPLC-MS/MS method for the determination of difenidol in human plasma / L. Yao, A. Chen, H. Yuan [et al.] // Discover Applied Sciences. – 2025. – Vol. 7. – P. 188. – DOI: 10.1007/s42452-025-06600-6.
135. Mahesh, P. Fast and Sensitive Bioanalytical Method for the Determination of Deucravacitinib in Human Plasma Using HPLC-MS/MS: Application and Greenness Evaluation / P. Mahesh, M. A. Haque, B. I. Salman [et al.] // Molecules. – 2023. – Vol. 28, № 14. – P. 5471. – DOI: 10.3390/molecules28145471.
136. Lee, S. Development and Validation of an Improved HPLC-MS/MS Method for Quantifying Total and Unbound Lenalidomide in Human Plasma / S. Lee, S. Yang, W.-S. Shim [et al.] // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16, № 10. – P. 1340. – DOI: 10.3390/pharmaceutics16101340.
137. Komarov, T. Development and validation of a High-Performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for quantification of major molnupiravir metabolite (β -D-N4-hydroxycytidine) in human plasma / T. Komarov, A. Smith, B. Johnson [et al.] // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11, № 9. – P. 2356. – DOI: 10.3390/biomedicines11092356.
138. Комаров, Т. Н. Совместное определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / Т. Н. Комаров, П. К. Карнакова, О. А. Арчакова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 135–145. – DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145.
139. Комаров, Т. Н. Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС / Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, О. А. Мискив [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 1. – С. 99–108. – DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108.
140. Комаров, Т. Н. Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β -D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / Т. Н. Комаров, П. К. Карнакова, О. А. Арчакова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 215–226. – DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.

141. Rodina, T. A. Development of an HPLC-MS/MS Method for Quantitative Determination of Rivaroxaban in Human Blood Serum / T. A. Rodina, E. S. Mel'nikov, A. A. Aksenov [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2018. – Vol. 52, № 4. – P. 372–377. – DOI: 10.1007/s11094-018-1824-3.
142. Rodina, T. A. Simultaneous Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, and Warfarin in Human Blood Serum by HPLC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring / T. A. Rodina, E. S. Melnikov, A. A. Aksenov [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2022. – Vol. 56, № 3. – P. 289–293. – DOI: 10.1007/s11094-022-02633-y.
143. Li, W. Basic sample preparation techniques in LC-MS bioanalysis: protein precipitation, liquid–liquid extraction, and solid-phase extraction / W. Li, W. Jian, Y. Fu // *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* / edited by Wenkui Li, Wenying Jian, Yunlin Fu. – Hoboken: John Wiley & Sons, 2019. – P. 1–30. – DOI: 10.1002/9781119274315.ch1.
144. Moein, M. M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies / M. M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim // *Journal of Chromatography B*. – 2017. – Vol. 1043. – P. 3–11. – DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.028.
145. Ashri, N. Y. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices / N. Y. Ashri, M. Abdel-Rehim // *Bioanalysis*. – 2011. – Vol. 3, № 17. – P. 2003–2018. – DOI: 10.4155/bio.11.201.

ПРИЛОЖЕНИЕ

**АКТЫ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ В
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ РАБОТУ**

УТВЕРЖДАЮ

И.о. ректора ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России,
д.фарм.н., профессор

И.А. Наркевич

« 28 » 2025 г.

**Акт внедрения
результатов научно-исследовательской работы
в научно-исследовательский процесс**

Комиссия в составе:

Председателя:	и.о. проректора по научной работе, доктор фармацевтических наук, профессора	Е.В. Флисюк
и членов комиссии:	директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, кандидата биологических наук, доцента	И.А. Титович
	заведующего аспирантурой, кандидата технических наук	Н.Е. Шашкиной

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «08» декабря 2025 г. № 589, составила акт о нижеследующем:

Результаты диссертационной работы Карнаковой Полины Константиновны на тему «Биоаналитические исследования инновационных препаратов – производных малоновой кислоты», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «аналитические подходы к проведению фармакокинетических исследований препаратов на основе малобена и этмабена» использованы в научно-исследовательской деятельности ИЛ ЦККЛС ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, «результаты исследований фармакокинетики препаратов малобена и этмабена у здоровых добровольцев» использованы в научно-исследовательской деятельности ЦЭФ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Выписка из Протокола внутреннего обучения персонала ИЛ ЦККЛС ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Протокол № 2 от 20.03.2026 г.) и выписка из Протокола собрания ЦЭФ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Протокол № 3-26 от 07.04.2026 г.) прилагаются.

Председатель:	и.о. проректора по научной работе, доктор фармацевтических наук, профессор	Е.В. Флисюк
члены комиссии:	директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, кандидат биологических наук, доцент	И.А. Титович
	заведующий аспирантурой, кандидат технических наук	Н.Е. Шашкина



Общество с ограниченной ответственностью
«ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»

Юр./факт. адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д.8, пом. I/I.
ИНН 9701010444, КПП 772701001, ОГРН 1157746853780, ОКПО 49285758,
Р/с 40702810838000271503 в ПАО СБЕРБАНК г. Москва, к/с 30101810400000000225,
website: cpha.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ЦФА»
д.фарм.н., Шохин И. Е.

« 22 » сентября 2025



Акт внедрения

Предмет внедрения: биоаналитические методики определения производных малоновой кислоты – малобена и этмабена – в плазме крови человека, применяемые для проведения фармакокинетических исследований препаратов малобена и этмабена, результаты проведения исследований фармакокинетики препаратов малобена и этмабена.

Кем предложен: соискателем учёной степени кандидата фармацевтических наук Карнаковой Полиной Константиновной, старшим химиком-аналитиком исследовательского центра ООО «ЦФА».

Кем и где выдан: исследовательский центр ООО «ЦФА».

Цель внедрения: проведение исследований фармакокинетики препаратов этмабена и малобена в рамках проведения I фаз клинических исследований.

Результат внедрения: предложение методологические основы и подходы внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «ЦФА».

Директор исследовательского центра, д.фарм.н.



Комаров Т. Н.



УТВЕРЖДАЮ
 проректор ЮКМА по стратегическому
 развитию и науке
 профессор Н.Е. Ауенов
 «02» апреля 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ №

Предмет внедрения: методики определения производных малоновой кислоты – малобена и этмабена – в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, а также исследования фармакокинетики препаратов малобена и этмабена.

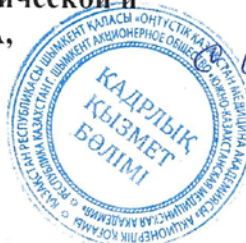
Авторы внедрения: Карнакова Полина Константиновна, соискатель ученой степени кандидата фармацевтических наук, старший химик-аналитик исследовательского центра ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», г. Москва, Россия.

Где внедрено: кафедра фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии (ЮКМА), г. Шымкент, Республика Казахстан.

Цель внедрения: теоретическое обоснование и практическое применение ВЭЖХ-МС/МС-методик для проведения исследований фармакокинетики лекарственных средств на основе производных малоновой кислоты.

Результаты внедрения: предложенные методики определения малобена и этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС внедрены в образовательный процесс на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ЮКМА в рамках дисциплин «Фармацевтическая химия» и «Токсикологическая химия»; результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность кафедры фармацевтической и токсикологической химии ЮКМА.

Заведующая кафедрой фармацевтической и
 токсикологической химии ЮКМА,
 д.фарм.н., профессор



С.К. Ордабаева
 ҚҰЖАТТАРДЫҢ ҚОЛДАРЫН АЙҚЫНДАЙМЫН
 ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН
 МЕДИЦИНА АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
 КАДРЛЫҚ ҚЫЗМЕТ БӨЛІМІ