



Валидация биоаналитической методики определения и оценка фармакокинетики нового лекарственного средства на основе полисахарида аира болотного в эксперименте на лабораторных животных

С. В. Кривошеков¹✉, Е. А. Яновская², Р. В. Гурто², О. С. Брюшнина², Д. А. Исаков¹,
А. В. Зыкова¹, Ю. Г. Зюзькова², А. М. Гурьев¹, В. В. Удут², М. В. Белоусов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга. 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

✉ Контактное лицо: Кривошеков Сергей Владимирович. E-mail: ksv_tsu@mail.ru

ORCID: С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;
Е. А. Яновская – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;
Р. В. Гурто – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;
О. С. Брюшнина – <https://orcid.org/0000-0002-7479-0733>;
Д. А. Исаков – <https://orcid.org/0009-0005-9919-7353>;
А. В. Зыкова – <https://orcid.org/0009-0008-9365-800X>;
Ю. Г. Зюзькова – <https://orcid.org/0000-0002-1400-8914>;
А. М. Гурьев – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;
В. В. Удут – <https://orcid.org/0000-0002-3829-7132>;
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 03.04.2024

Статья принята в печать: 11.09.2024

Статья опубликована: 13.09.2024

Резюме

Введение. $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронан – водорастворимый гетерополисахарид, выделенный из корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.) и обладающий противоопухолевым, антиметастатическим, иммуномодулирующим и гепатопротекторным действием, защитным действием на угнетенное в ходе цитостатического лечения кроветворение.

Цель. Валидация биоаналитической методики определения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. и изучение фармакокинетических параметров нового лекарственного средства на его основе после однократного введения 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам.

Материалы и методы. В исследовании использованы в качестве основных животных 8 крыс-самцов (средняя масса – 300 г). В качестве второго вида животных использовали 6 кроликов-самцов (средняя масса тела – 2,5 кг). Эксперимент по оценке доз проведен на 24 кроликах (масса тела – 2,3–2,5 кг). Количественное определение $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. в плазме крови животных проводили методом ВЭЖХ-МС/МС, аналитическая форма – галактурононовая кислота. Методика пробоподготовки биообразцов включала стадию ферментативного гидролиза $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. раствором пектиназы до образования галактурононовой кислоты.

Результаты и обсуждение. Изучена фармакокинетика нового лекарственного средства $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. после однократного введения доз 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме кролика составило $1,0 \pm 0,21$ ч, время полувыведения – $0,7 \pm 0,15$ ч. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме крысы составило 1,16 ч, время полувыведения $T_{1/2}$ – 0,80 ч. После однократного внутривенного введения кроликам 24, 30 и 42 мг/кг максимальная концентрация в системном кровотоке достигается через 5 мин после введения и составляет в среднем

© Кривошеков С. В., Яновская Е. А., Гурто Р. В., Брюшнина О. С., Исаков Д. А., Зыкова А. В., Зюзькова Ю. Г., Гурьев А. М., Удут В. В., Белоусов М. В., 2024

© Krivoshchekov S. V., Yanovskaya E. A., Gurto R. V., Bryushinina O. S., Isakov D. A., Zyкова A. V., Zyuz'kova Yu. G., Guryev A. M., Udut V. V., Belousov M. V., 2024

133,95 ± 27,04, 145,86 ± 40,90 и 226,13 ± 41,27 мкг/мл соответственно, период полураспределения варьировался от 0,22 до 0,26 ч, период полувыведения – от 3,52 до 3,96 ч.

Заключение. Проведена оценка фармакокинетических параметров α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. на животных, основанная на использовании методики количественного определения галактуроновой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: полисахарид, α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуронан, галактуроновая кислота, аир болотный, *Acorus calamus* L., фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС

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

Вклад авторов. Е. А. Яновская, Р. В. Гурто, Ю. Г. Зюзькова и О. С. Брюшнина проводили введение лекарственной формы и забор крови у кроликов. Е. А. Яновская и С. В. Кривошеков проводили количественное определение α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуронана в плазме методом ВЭЖХ-МС/МС. С. В. Кривошеков, М. В. Белоусов, А. М. Гурьев и В. В. Удут разработали дизайн эксперимента провели окончательную корректировку статьи. Е. А. Яновская, С. В. Кривошеков, Д. А. Исаков и А. В. Зыкова провели литературный поиск по научному направлению и написание текста статьи. Е. А. Яновская и С. В. Кривошеков провели расчеты и статистическую обработку результатов эксперимента.

Финансирование. Работа выполнена в рамках прикладного научного исследования 720000Ф.99.1.БН62АБ30000 в рамках государственного задания № 056-00116-23-01.

Для цитирования: Кривошеков С. В., Яновская Е. А., Гурто Р. В., Брюшнина О. С., Исаков Д. А., Зыкова А. В., Зюзькова Ю. Г., Гурьев А. М., Удут В. В., Белоусов М. В. Валидация биоаналитической методики определения и оценка фармакокинетики нового лекарственного средства на основе полисахарида аира болотного в эксперименте на лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):190–201. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1795>

Pharmacokinetics of a new drug based on polysaccharide from *acorus calamus* in an experiment on laboratory animals

Sergei V. Krivoshchekov¹✉, Elena A. Yanovskaya², Roman V. Gurto², Olga S. Bryushinina², Denis A. Isakov¹, Anastasia V. Zyкова¹, Yulia G. Zyuz'kova², Artem M. Guryev¹, Vladimir V. Udut², Mikhail V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

² Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine. 3, Prospekt Lenina, Tomsk, 634028, Russia

✉ **Corresponding author:** Sergei V. Krivoshchekov. **E-mail:** ksv_tsu@mail.ru

ORCID: Sergei V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;

Elena A. Yanovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;

Roman V. Gurto – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;

Olga S. Bryushinina – <https://orcid.org/0000-0002-7479-0733>;

Denis A. Isakov – <https://orcid.org/0009-0005-9919-7353>;

Anastasia V. Zyкова – <https://orcid.org/0009-0008-9365-800X>;

Yulia G. Zyuz'kova – <https://orcid.org/0000-0002-1400-8914>;

Artem M. Guryev – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;

Vladimir V. Udut – <https://orcid.org/0000-0002-3829-7132>;

Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 03.04.2024

Accepted: 11.09.2024

Published: 13.09.2024

Abstract

Introduction. α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane is a water-soluble heteropolysaccharide isolated from the rhizomes of calamus marsh (*Acorus calamus* L.) and has antitumor, antimetastatic, immunomodulatory and hepatoprotective effects, protective effect on hematopoiesis suppressed during cytostatic treatment.

Aim. Validation of the bioanalytical method for the determination of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. and the study of the pharmacokinetic parameters of a new drug based on it after a single administration of 120 mg/kg to rats and 24, 30, 42 mg/kg to rabbits.

Materials and methods. In the study, 8 male rats (average weight – 300 g) were used as the main animals. 6 male rabbits (average body weight – 2.5 kg) were used as an additional animal species. The dose assessment experiment was carried out on 24 rabbits (body weight – 2.3–2.5 kg). The quantitative determination of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in the blood plasma of animals was carried out by HPLC-MS/MS, the analytical form was galacturonic acid. The method of sample preparation of biological samples included the stage of enzymatic hydrolysis of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. with a solution of pectinase for the formation of galacturonic acid.

Results and discussions. The pharmacokinetics of the new drug $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. was studied after a single dose of 120 mg/kg to rats and 24, 30, 42 mg/kg to rabbits. The average residence time of the drug in the rabbit's body was 1.0 ± 0.21 hours, the half-life was 0.7 ± 0.15 hours. The average residence time of the drug in the rat body was 1.16 hours, the half-life $T_{1/2}$ was 0.80 hours. After a single intravenous administration to rabbits of 24, 30 and 42 mg/kg, the maximum concentration in the systemic bloodstream is reached 5 minutes after administration and averages 133.95 ± 27.04 , 145.86 ± 40.90 and 226.13 ± 41.27 $\mu\text{g/ml}$, respectively, the half-life ranged from 0.22 to 0.26 h, the half-life from 3.52 to 3.96 hours.

Conclusion. The pharmacokinetic parameters of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. were evaluated in animals based on the use of the method of quantitative determination of galacturonic acid by HPLC-MS/MS.

Keywords: polysaccharide, $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane, galacturonic acid, *Acorus calamus* L., pharmacokinetics, HPLC-MS/MS

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

Contribution of the authors. Elena A. Yanovskaya, Roman V. Gurto, Yulia G. Zyuz'kova and Olga S. Bryushinina the dosage form was administered and blood was collected from rabbits. Elena A. Yanovskaya and Sergei V. Krivoshchekov performed quantitative determination of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronan in plasma by HPLC-MS/MS. Sergei V. Krivoshchekov, Mikhail V. Belousov, Artem M. Guryev and Vladimir V. Udut developed the experimental design and carried out the final revision of the article. Elena A. Yanovskaya, Sergei V. Krivoshchekov, Denis A. Isakov and Anastasia V. Zykova conducted a literature search in the scientific field and wrote the text of the article. Elena A. Yanovskaya and Sergei V. Krivoshchekov carried out calculations and statistical processing of the experimental results.

Funding. The work was carried out within the framework of applied scientific research 720000F.99.1.BN62AB30000 within the framework of state assignment No. 056-00116-23-01.

For citation: Krivoshchekov S. V., Yanovskaya E. A., Gurto R. V., Bryushinina O. S., Isakov D. A., Zykova A. V., Zyuz'kova Yu. G., Guryev A. M., Udut V. V., Belousov M. V. Pharmacokinetics of a new drug based on polysaccharide from *acorus calamus* in an experiment on laboratory animals. *Drug development & registration*. 2024;13(4):190–201. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1795>

ВВЕДЕНИЕ

$\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуран является водорастворимым полисахаридом, выделенным из корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.). Ранее проведенные доклинические исследования по оценке эффективности показали, что $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуран *Acorus calamus* L. обладает антиметастатическим, иммуномодулирующим и гепатопротекторным действием, оказывает защитное действие на угнетенное в ходе цитостатического лечения кроветворение, стимулирует регенеративные процессы в тонком кишечнике в условиях экспериментального опухолевого роста [1–4].

На всех этапах разработки нового лекарственного средства необходимо уделять особое внимание исследованию безопасности [5–7]: так, на первом этапе доклинических исследований оценивают токсичность, в том числе и генотоксичность [8–10]. После установления отсутствия выраженных токсических

эффектов, которые бы затруднили использование препарата в клинической практике, должна быть проведена оценка фармакокинетики лекарственного средства, которая включает изучение процессов абсорбции, распределения и элиминации из организма и требует разработки и валидации биоаналитической методики [11–12].

В связи с тем, что молекулярная масса действующего вещества превышает аналитический диапазон детектируемых масс подавляющего большинства масс-анализаторов, которые чаще всего применяются для определения фармакокинетических параметров веществ [13–14], не обладающих хромофорными и флуорофорными группами, оценку концентрации препарата в биологических объектах предложено проводить по галактуроносовой кислоте.

Главная цепь макромолекулы лекарственного средства на основе $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. (полисахаридный кор) состоит из α -1,4-связанных остатков D-галактопиранозилураноносовой кислоты, между которыми

располагаются остатки α -L-рамнопиранозы, включенные в основную цепь галактуронана α -1,2-связями и образующие линейную область рамногалактуронана; разветвленная часть представлена небольшим количеством нейтральных сахаров (глюкоза, галактоза, арабиноза) [15]. В предлагаемом алгоритме количественного определения действующего вещества в биологических пробах по градуировочным растворам α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. после ферментативного гидролиза пектиназой (Pectinase from *Aspergillus niger*, CAS 9032-75-1, Sigma-Aldrich, Дания) образуется галактуроновая кислота, для которой известны параметры распада молекулярного иона в режиме ионизации электрораспылением [16] и которая выступает аналитической формой лекарственного средства.

Целью настоящей работы являлось валидирование биоаналитической методики определения α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. и изучение фармакокинетических параметров нового лекарственного средства на его основе после однократного введения 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты поставлены на половозрелых конвенциональных аутбредных крысах (возраст – 3 месяца, масса тела крыс – 290–320 г) стока CD разводки отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга (г. Томск) и лабораторных кроликах (возраст – 2 месяца, масса тела – 2,3–2,5 кг), полученных из ЛПХ (личное подсобное хозяйство) «Барин», Томская область, Кривошеинский район, село Петровка (гражданско-правовой договор № 231 от 17 мая 2013 года; ветеринарное свидетельство 270 № 0028697 от 20 мая 2013).

Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), и правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. № 464н).

Лекарственное средство на основе α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. вводили крысам и кроликам внутривенно в виде раствора 10 мг/мл. Во время инъекций и забора крови животные были иммобилизованы, в дальнейшем животные находились в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде. Для оценки основных фармакокинетических параметров лекарственное средство вводили однократно в дозах 120 мг/кг крысам и 30 мг/кг кроликам. Для оценки линейности вводили кроликам однократно в дозах 24, 30 и 42 мг/кг.

В качестве основного биологического материала использовали плазму крови. Пробы крови у крыс после однократного болюсного внутривенного вве-

дения отбирали до введения лекарственного средства и через 5, 10, 30, 45 мин и 1, 2, 4, 5 и 8 ч после введения. Животных, находящихся под эфирным наркозом, декапитировали, образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отобранная плазма помещалась в чистые пробирки и хранилась при температуре -20 °C до проведения аналитического этапа работы.

Забор крови у кроликов осуществляли через ушную вену до введения исследуемого препарата и через 5, 10, 30, 45 мин и 1, 2, 4, 5 и 8 ч после введения. Образцы крови объемом 600–700 мкл помещали в гепаринизированные пробирки вместимостью 2 мл, центрифугировали со скоростью 5000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость перемещали в чистые пробирки и замораживали при -20 °C до выполнения хромато-масс-спектрометрического анализа.

α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронан *Acorus calamus* L. является водорастворимым гетерополисахаридом, а методика его количественного определения в биологических объектах основана на прямолинейной зависимости от определенного содержания галактуронозой кислоты, являющейся продуктом его ферментативного гидролиза [17–18]. Количественное определение α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана в плазме крови проводили с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, обладающего высокой чувствительностью и избирательностью [19–21]. Исследование проведено с использованием жидкостного хроматографа Dionex UltiMate™ 3000 и тройного квадрупольного масс-спектрометра API 2000 компании AB Sciex. Состав аналитической ВЭЖХ-МС-системы: насос для подачи подвижной фазы Dionex DGP-3600 SD; автоинжектор Dionex ACC-3000 со встроенным термостатом колонок; колонка аналитическая Dionex Acclaim OA, 4 × 250 мм, 5 мкм, с предколоночным картриджем; спектрофотометрический детектор Dionex VWD-3400RS; тройной квадрупольный масс-спектрометр API 2000 с электрораспылительным источником ионизации и программным обеспечением Analyst 1.5.2. Хроматографический анализ проводили в изократическом режиме, параметры хроматографического анализа:

- метод анализа – LC/MS/MS;
- колонка Dionex Acclaim OA, 4 × 250 мм, 5 мкм;
- температура в колонке – 29 °C;
- подвижная фаза – ACN: 0,1%-я HCOOH (88:12, v/v);
- скорость потока – 0,6 мл/мин;
- объем инъекции аналита – 20 мкл;
- время анализа – 6 мин.

Электрораспылительный источник ионизации работал в отрицательном режиме, с напряжением на капилляре $-4,5$ кВ. Температура нагрева осушающего газа – 400 °C. Подача газа-распылителя (азот) – 60 psi, осушающего газа (азот) – 70 psi, подача газа завесы (азот) – 40 psi. Потенциал декласте-

ризации -16 В, фокусирующий потенциал -270 , энергия соударения -26 эВ, окно MRM-детектирования 40 с. Для количественного определения использовали MRM-переход $193/59$ m/z. Пример хроматограммы стандартного раствора галактуроновой кислоты приведен на рисунке 1.

Ферментативный гидролиз осуществлялся с использованием раствора пектиназы с активностью $3,8$ ЕД/мл в формиатном буфере (pH $4,0$) (Pectinase from *Aspergillus niger*, CAS $9032-75-1$, Sigma-Aldrich).

Приготовление формиатно-аммиачного буфера: $1,1214$ г формиата аммония растворяли в 50 мл воды и добавляли $0,377$ мл 98% HCOOH (муравьиной кислоты). Измеряли pH раствора потенциометрически. При необходимости доводили pH до $4,0$ добавлением муравьиной кислоты или раствора аммиака.

Пробоподготовка осуществлялась следующим образом: аликвоту плазмы объемом 250 мкл помещали в чистые круглодонные пробирки объемом 2 мл, добавляли 250 мкл формиатно-аммиачного буфера (pH $4,0$) и 10 мкл раствора пектиназы $3,8$ ЕД/мл. Затем инкубировали в термостате при температуре 37 °C в течение 24 ч для достижения полноты конверсии. После инкубирования образцы доставали из термостата и помещали в каждую пробирку 500 мкл ацетонитрила. Перемешивали на орбитальном шейкере (Biosan, Латвия) в течение 2 мин при 2500 об/мин, затем центрифугировали при $10\,000$ g и отбирали супернатант. Подготовленные таким образом образцы использовались для хроматографического анализа в объеме 20 мкл.

Расчет фармакокинетических параметров осуществляли модельным способом [22–23]. Параметры гибридных микроконстант β и α , предэкспоненциальные множители (A , B) для уравнения, описывающего изменение концентрации вещества в центральной камере, определяли графически путем линейного регрессионного анализа терминального участка (β -фаза) и участка распределения (α -фаза) кривой в полулогарифмических координатах.

Рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: C_0 – максимальное экспериментальное значение концентрации лекарственного средства в плазме крови после однократного введения лекарственного средства; AUC_{0-t} – площадь под экспериментальной кривой концентрации лекарственного средства в плазме крови за исследуемый период; Cl – общий клиренс; V_d – объем распределения лекарственного средства; MRT – среднее время удерживания лекарственного средства в организме; k_{el} – константа элиминации. Для вычисления C_t и k_{el} конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Константу элиминации (k_{el}), константы, характеризующие распределение вещества по периферическим органам и тканям (k_{12} , k_{21}), период полувыведения ($T_{1/2\beta}$), период полураспределения ($T_{1/2\alpha}$), объем распределения в центральной камере (V_1), стационарный объем (V_{ss}) вычисляли согласно стандартным соотношениям применительно к двухкамерной модели.

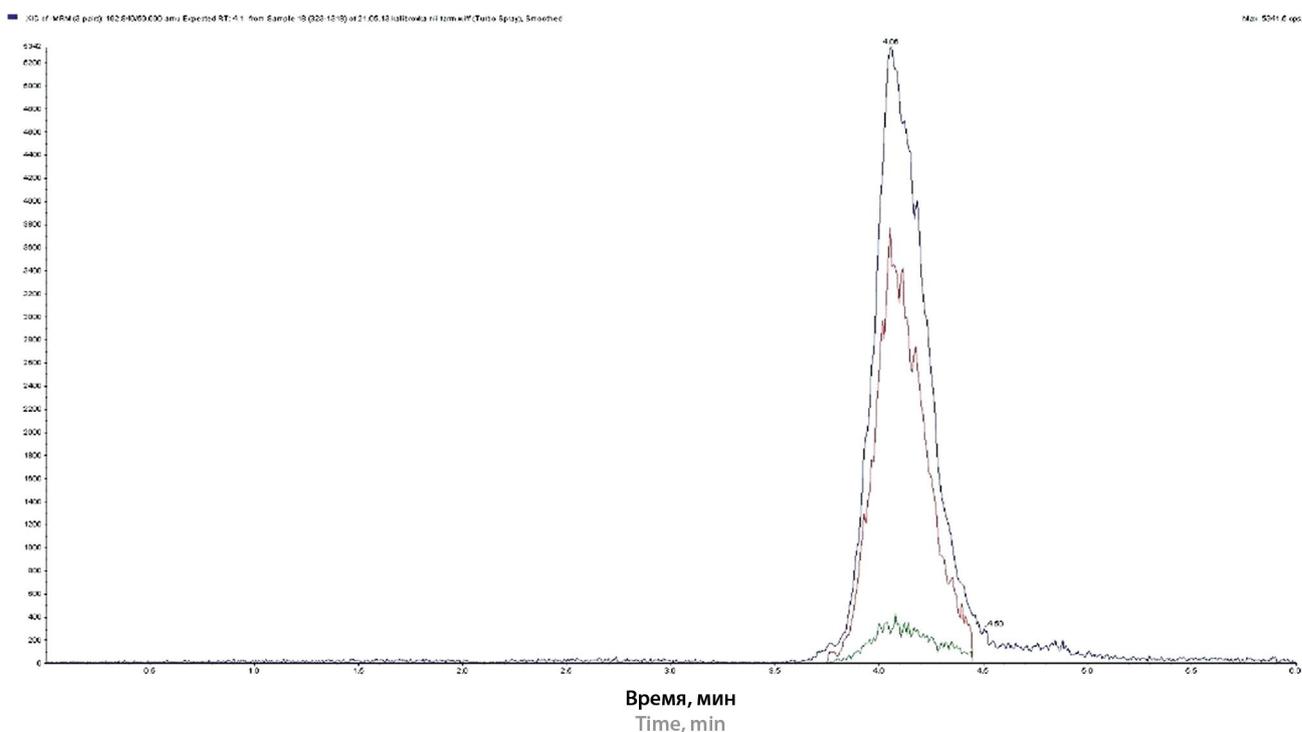


Рисунок 1. Хроматограмма галактуроновой кислоты

Figure 1. Chromatogram of galacturonic acid

Внемодельные параметры, такие как среднее время удерживания (MRT), площадь под фармакокинетической кривой зависимости «концентрация – время» в интервале от 0 до t (AUC_{0-t}), площадь под кривой зависимости «концентрация – время» в интервале от 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), площадь под кривой в координатах $C(t) \times t - t$ ($AUMC_{0-\infty}$), рассчитывали по следующим формулам:

$$AUC_{0-t} = \sum_{i=0}^n (C_i + C_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i) / 2, \quad (1)$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_n / \beta, \quad (2)$$

$$AUMC_{0-\infty} = AUMC_{0-t} + C_n \times t_n / \beta + C_n / (\beta)^2, \quad (3)$$

$$MRT = AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}, \quad (4)$$

где C_n – последняя измеренная концентрация.

Клиренс вычисляли по формуле:

$$Cl = \frac{D}{AUC_{0-\infty}}. \quad (5)$$

Значение максимальной концентрации (C_0) определяли исходя из полученных экспериментальных данных. Отклонение расчетных значений концентраций от экспериментальных рассчитывали по формуле:

$$C_0 = 100 - (C_{\text{эксп.}} \cdot 100 / C_{\text{теор.}}). \quad (6)$$

Статистическую обработку полученных в эксперименте данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica версии 10.0.1011.6 и Microsoft Excel (версия Excel 2013 для Windows). Использовали методы вариационной статистики [24]. Рассчитывали среднее арифметическое значение

(M), стандартное отклонение (σ), значение вероятности (p). При оценке линейности сравнивали значения с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, поскольку фармакокинетические параметры, такие как C_{max} и AUC , не подчиняются нормальному закону распределения. Оценку параметров проводили при доверительной вероятности 95 % ($p = 0,95$) [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представлены основные результаты проведенной валидационной оценки используемой методики количественного определения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана после ферментативного гидролиза в эксперименте на половозрелых конвенциональных аутбредных крысах стока CD разведения отдела экспериментальных биологических моделей ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (таблица 1).

Методика характеризуется линейностью в диапазоне концентраций от 0,09 до 800 мкг/мл, обладает достаточной чувствительностью, позволяет анализировать содержание $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана по аналитической форме – галактуроновой кислоте.

Определение концентрации лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного введения в дозе 120 мг/кг начинали производить через 5 мин после инъекции. Расчет фармакокинетических параметров лекарственного средства в плазме крови крыс (на основе средних значений концентраций препарата в плазме крови животных) после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг представлен в таблице 2. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме крысы составило 1,16 ч, время полувыведения $T_{1/2} - 0,80$ ч.

Таблица 1. Характеристики валидационной оценки биоаналитической методики количественного определения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L.

Table 1. Characteristics of the validation assessment of the bioanalytical technique for the quantitative determination of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L.

Биологическая матрица The biological matrix	Уровень 1 Level 1		Уровень 2 Level 2		Уровень 3 Level 3		Степень извлечения, % Degree of extraction, %	ПКО, мкг/мл Detection and quantitation limit, µg/ml	Точность, % Accuracy, %
	σ_r	σ_R	σ_r	σ_R	σ_r	σ_R			
Плазма крови Blood plasma	9,71	6,5	2,84	5,8	1,77	5,57	58,8	0,088	98,15

Примечание. σ_r – значение относительного стандартного отклонения среднего результата внутрисерийного эксперимента; σ_R – значение относительного стандартного отклонения среднего результата межсерийного эксперимента; ПКО – нижний предел количественного определения. Уровень 1 – 1 мкг/мл; уровень 2 – 250 мкг/мл; уровень 3 – 800 мкг/мл.

Note. σ_r – the value of the relative standard deviation of the average result of the intra-batch experiment; σ_R – the value of the relative standard deviation of the average result of the inter-run experiment; The LOQ is the lower limit of quantitation. Level 1 – 1 µg/ml; level 2 – 250 µg/ml; level 3 – 800 µg/ml.

Таблица 2. Концентрация $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. в плазме крови крыс после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мкг/мл

Table 2. Concentration of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in rat blood plasma after a single intravenous bolus injection, at a dose of 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$

№	Время, ч Time, h							
	0,083	0,167	0,5	0,75	1	2	4	8
1	44,93	44,66	13,00	13,41	10,29	7,44	5,73	3,24
2	53,22	29,04	16,00	13,41	10,55	8,86	6,58	5,31
3	54,49	37,67	15,50	11,61	8,45	9,19	6,09	5,28
4	52,36	38,65	15,54	13,87	11,56	9,71	6,89	5,35
5	48,35	35,24	13,25	12,11	10,03	8,27	5,44	4,69
6	50,86	34,39	13,87	13,78	11,28	9,99	6,64	4,52
7	41,76	31,76	15,14	12,00	9,19	8,19	6,79	6,05
8	47,97	38,62	13,80	12,98	12,22	9,71	6,51	4,36
M	49,24	36,25	14,51	12,90	10,45	8,92	6,33	4,85
σ	4,35	4,79	1,16	0,87	1,25	0,90	0,53	0,85
CV%	9,69	10,73	8,92	6,51	12,09	12,07	9,17	26,22

Установлено, что максимальная скорость снижения концентрации и основное распределение определяемого вещества в организме наблюдались в первый час после введения.

Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг представлен на рисунке 2.

Фазу выведения препарата из организма наблюдали в последующие часы измерения концентрации: за 7 ч наблюдения концентрация препарата в плазме крови крыс снизилась в 2,2 раза и составила в ко-

нечной точке $4,85 \pm 0,85$ мкг/мл. Расчет фармакокинетических параметров лекарственного средства в плазме крови крыс (на основе средних значений концентраций препарата в плазме крови животных) после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг представлен в таблице 3.

Фармакокинетические кривые $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. в плазме крови кроликов описываются с помощью двухкамерной модели, рассчитанные значения концентраций в центральной камере и отклонение их от экспериментальных значений приведены в таблице 4.

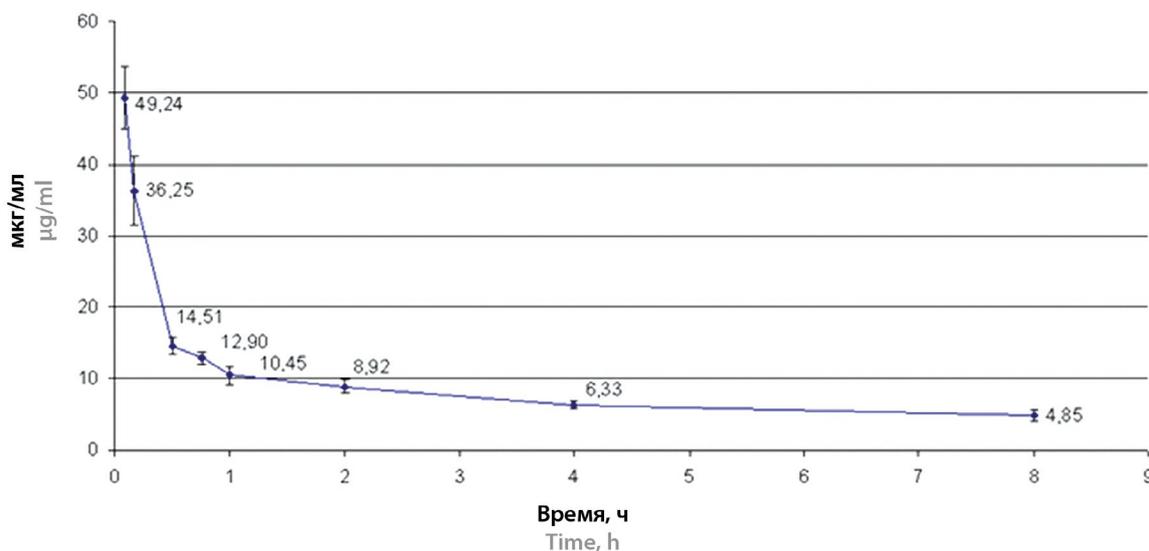


Рисунок 2. Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг

Figure 2. The average pharmacokinetic profile of the drug in rat blood plasma after a single intravenous injection at a dose of 120 mg/kg

Таблица 3. Фармакокинетические характеристики $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранона *Acorus calamus* L. в плазме крови крыс после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг

Table 3. Pharmacokinetic characteristics of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in rat blood plasma after a single bolus intravenous injection at a dose of 120 mg/kg

C_0 , мкг/мл C_0 , µg/ml	AUC_{0-t} мкг·г/мл AUC_{0-t} µg·g/ml	V_d , л/кг V_d , l/kg	CL , л/(кг·ч) CL , l/(kg·h)	MRT, ч MRT, h	k_{el} , ч ⁻¹ k_{el} , h ⁻¹	$T_{1/2}$
60,78	70,23	1974,37	1708,57	1,16	0,87	0,80

Усредненные фармакокинетические профили $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранона *Acorus calamus* L. в плазме крови кроликов после однократного введения в дозах 24, 30 и 42 мг/кг приведены на рисунке 3.

Результаты расчета фармакокинетических параметров при введении препарата кроликам в дозах 24, 30 и 42 мг/кг представлены в таблице 5.

Наибольшие концентрации после однократного внутривенного введения 3 исследуемых доз наблюдались через 5 мин после введения и в среднем составили $133,95 \pm 27,04$, $145,86 \pm 40,90$ и $226,13 \pm 41,27$ мкг/мл для доз 24, 30 и 42 мг/кг соответственно. Регрессионный анализ кривой зависимости «концентрация – время» показал, что элиминация вещества из организма кроликов имеет двухфазный характер. В первой фазе (α -фаза) за счет быстрого распределения в периферические ткани наблюдалось резкое снижение концентрации исследуемого препарата. Период полураспределения в среднем составил $14 \div 15$ мин

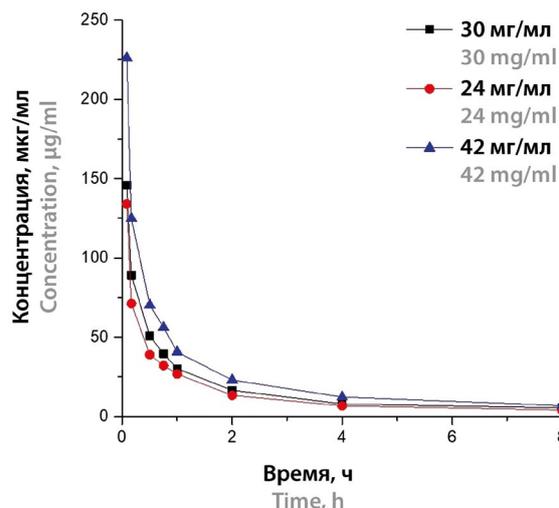


Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические кривые $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D галактопиранозилуранона *Acorus calamus* L. в плазме крови кроликов после однократного введения в дозах 24, 30 и 42 мг/кг

Figure 3. Average pharmacokinetic curves of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in the blood plasma of rabbits after a single dose of 24, 30 and 42 mg/kg

и незначительно зависел от введенной дозы. Коэффициент детерминации в диапазоне от 0,08 до 0,75 ч составил не менее 0,9. Вторая фаза (β -фаза) характеризует элиминацию вещества из организма. Коэффициент детерминации терминального участка кривой в диапазоне от 1 до 8 ч варьировался от 0,87 до 0,94 в зависимости от дозы. Значения периода полувыве-

Таблица 4. Результаты расчетных значений концентраций $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранона *Acorus calamus* L. с помощью двухкамерной модели

Table 4. Results of calculated concentration values $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. using a two-chamber model

Время, ч Time, h	Однократное введение Single injection					
	Доза 24 мг/кг The dose is 24 mg/kg		Доза 30 мг/кг The dose is 30 mg/kg		Доза 42 мг/кг The dose is 42 mg/kg	
	$C_{расч.}$ $C_{calc.}$	Отклонение Deviation	$C_{расч.}$ $C_{calc.}$	Отклонение Deviation	$C_{расч.} \pm \sigma$ $C_{calc.} \pm \sigma$	Отклонение Deviation
	мкг/мл µg/ml	%	мкг/мл µg/ml	%	мкг/мл µg/ml	%
0,083	110	21,62	123,42	15,87	188,76	19,24
0,167	90,42	20,11	102,96	13,66	151,58	17,08
0,5	45,32	12,44	54,34	6,26	73,26	2,694
0,75	30,14	9,18	36,96	8,94	49,28	5,38
1	22,22	13,19	27,28	11,10	37,29	7,17
2	12,43	7,48	15,18	9,54	22,66	2,48
4	8,03	16,61	10,01	19,60	14,85	16,84
8	3,74	8,93	4,84	11,47	6,93	0,512

Таблица 5. Результаты фармакокинетических параметров после однократного и многократного введения ($n = 6; M \pm \sigma$)

Table 5. Results of pharmacokinetic parameters after single and multiple injection ($n = 6; M \pm \sigma$)

Параметр Parameter	Единица измерения Unit	Доза 24 мг/кг The dose is 24 mg/kg	Доза 30 мг/кг The dose is 30 mg/kg	Доза 42 мг/кг The dose is 42 mg/kg
α	1/ч 1/h	3,19 ± 0,55	2,75 ± 0,66	3,08 ± 0,88
β	1/ч 1/h	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03
A	мкг/мл µg/ml	120,78 ± 24,53	128,15 ± 39,82	205,59 ± 49,5
B	мкг/мл µg/ml	17,49 ± 4,07	20,35 ± 1,1	32,45 ± 5,06
$t_{1/2\beta}$	ч h	3,96 ± 1,21	3,85 ± 0,22	3,74 ± 0,66
$t_{1/2\alpha}$	ч h	0,22 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,24 ± 0,05
T_{\max}	ч h	0,99 ± 0,11	1,10 ± 0,11	0,99 ± 0,11
k_{21}	1/ч 1/h	0,55 ± 0,11	0,55 ± 0,22	0,55 ± 0,11
k_{12}	1/ч 1/h	1,76 ± 0,44	1,43 ± 0,44	1,65 ± 0,66
k_{el}	1/ч 1/h	1,10 ± 0,11	0,88 ± 0,11	0,99 ± 0,22
V_1	мл/кг ml/kg	177,98 ± 28,38	218,57 ± 65,12	183,15 ± 33,66
V_{ss}	мл/кг ml/kg	753,83 ± 200,31	757,68 ± 175,45	692,12 ± 69,85
V_{area}	мл/кг ml/kg	1049,29 ± 264,44	1073,71 ± 118,8	1030,15 ± 167,97
V_{extrap}	мл/кг ml/kg	1462,23 ± 410,08	1476,97 ± 77,22	1328,03 ± 210,32
Cl	мл/(кг · ч) ml/(kg · h)	186,67 ± 9,46	192,06 ± 22,44	193,27 ± 5,83
$AUC_{0-\infty}$	мкг·ч/мл µg · h/ml	128,92 ± 6,93	158,29 ± 18,48	217,47 ± 6,49
$AUMC_{0-\infty}$	мкг · ч ² /мл µg · h ² /ml	562,10 ± 197,23	686,07 ± 90,09	873,84 ± 105,71
MRT	ч h	4,29 ± 1,21	4,40 ± 0,55	3,96 ± 0,44

дения изменялись в интервале от 3,74 до 3,96 ч. Предел обнаружения не был достигнут через 8 ч после введения, концентрация в последней временной точке в среднем изменялась от 4,11 ± 0,46 до 6,87 ± 0,32 мкг/мл соответственно. Значения для $AUC_{0-\infty}$ составили 128,92 ± 6,93, 158,29 ± 18,48 и 217,47 ± 6,49 мкг · ч/мл по мере увеличения дозы. Среднее время удерживания вещества в организме кроликов составило в среднем 4,2 ч, статистически значимых ($N = 1,82, p = 0,40$) различий между дозами для данного параметра не обнаружено. Стационарный объем распределения составил для доз 24, 30 и 42 мг/кг 753,83 ± 200,31, 757,68 ± 175,45 и 692,12 ± 69,85 мл/кг соответственно. Полученные значения стационарно-

го объема распределения в 4 раза превышают значение объема распределения в центральной камере и в 1,3 раза превышают значение общего объема воды в организме кроликов (583,3 мл/кг), что свидетельствует об экстенсивном связывании с белками тканей в периферической камере.

Сравнительный анализ фармакокинетических параметров трех исследуемых доз показал инвариантность параметров относительно дозы и отсутствие статистически значимых ($N = 0,98, p = 0,62$) различий в значениях $AUC_{0-\infty}$, нормированных относительно дозы, следовательно, можно сделать вывод о линейном характере фармакокинетики в диапазоне исследуемых доз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена фармакокинетика нового лекарственного средства $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus* L. после однократного введения доз 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме кролика составило $1,0 \pm 0,21$ ч, время полувыведения $T_{1/2} - 0,7 \pm 0,15$ ч. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме крысы составило 1,16 ч, время полувыведения $T_{1/2} - 0,80$ ч.

Результаты изучения фармакокинетике после однократного введения в дозах 24, 30 и 42 мг/кг показали, что кинетика элиминации имеет двухфазный характер, среднее время удерживания вещества в организме кроликов составило 4,2 ч, период полувыведения – 3,85 ч. Значение стационарного объема распределения свидетельствует о связывании его с белками тканей в периферической камере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурьев А. М., Белоусов М. В., Юсубов М. С., Ахмеджанов Р. Р., Зуева Е. П., Лопатина К. А. Исследование острой токсичности комплекса водорастворимых полисахаридов корневищ айра болотного (*Acorus calamus* L.). *Бюллетень сибирской медицины*. 2010;9(1):36–39. DOI: 10.20538/1682-0363-2010-1-36-39.
2. Лопатина К. А., Разина Т. Г., Зуева Е. П., Крылова С. Г., Гурьев А. М., Амосова Е. Н., Рыбалкина О. Ю., Сафонова Е. А., Ефимова Л. А., Белоусов М. В. Доклиническое исследование лекарственной формы $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана из корневищ айра болотного *Acorus calamus* L. в онкологическом эксперименте. *Сибирский онкологический журнал*. 2015;1:59–63.
3. Лопатина К. А., Гурьев А. М., Разина Т. Г., Амосова Е. Н., Крылова С. Г., Шилова Н. В., Зуева Е. П. Действие водорастворимых полисахаридов корневищ айра болотного на функциональную активность клеток лимфоузлов в условиях цитостатической терапии перививаемой опухоли. *Сибирский онкологический журнал*. 2006;3(19):59–63.
4. Сафонова Е. А., Гурьев А. М., Разина Т. Г., Зуева Е. П., Ефимова Л. А., Лопатина К. А. Повышение эффективности химиотерапии с помощью фармакологически активных фракций, выделенных из полисахаридного комплекса айра болотного (*Acorus calamus* L.). *Российский биотерапевтический журнал*. 2012;11(4):55–58.
5. Mugale M. N., Dev K., More B. S., Mishra V. S., Washimkar K. R., Singh K., Maurya R., Kumar Rath S., Chattopadhyay D., Chattopadhyay N. A Comprehensive Review on Preclinical Safety and Toxicity of Medicinal Plants. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*. 2024;4(1):100129. DOI: 10.1016/j.ccmp.2024.100129.
6. Namdari R., Jones K., Chuang S. S., Van Cruchten S., Dincer Z., Downes N., Mikkelsen L. F., Harding J., Jäckel S., Jacobsen B., Kinyamu-Akunda J., Lortie A., Mhedhbi S., Mohr S., Schmitt M. W., Prior H. Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105029. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105029.
7. Гурьев А. М., Белоусов М. В., Ахмеджанов Р. Р., Юсубов М. С., Чурин А. А., Карпова Г. В. Исследование влияния длительного введения водорастворимых полисахаридов айра болотного (*Acorus calamus* L.) на функциональные показатели лабораторных животных. *Бюллетень сибирской медицины*. 2010;9(6):18–23. DOI: 10.20538/1682-0363-2010-6-18-23.
8. Nesterkina M., Bilokon S., Alieksieieva T., Kravchenko I., Hirsch A. K. H. Genotoxic and mutational potential of monocyclic terpenoids (carvacrol, carvone and thymol) in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Reports*. 2023;10:327–333. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.02.009.
9. De Oliveira Dos Santos A. M., Duarte A. E., Costa A. R., da Silva A. A., Rohde C., Silva D. G., de Amorim É. M., da Cruz Santos M. H., Pereira M. G., Deprá M., de Santana S. L., da Silva Valente V. L., Teixeira C. S. Canavalia ensiformis lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;222(B):2823–2832. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061.
10. Неупокоева О. В., Лопатина К. А., Воронова О. Л., Сафонова Е. А., Зуева Е. П., Чурин А. А. Изучение мутагенных свойств $\alpha(1,2)$ -1-рамно- $\alpha(1,4)$ -d-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;(2):22–23.
11. Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2013. 944 с.
12. Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. Организация фармакокинетических исследований. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2021;3:12–19. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
13. Wu W., Li K., Zhao C., Ran X., Zhang Y., Zhang T. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of luteolin, resveratrol and their metabolites in rat plasma and its application to pharmacokinetic interaction studies. *Journal of Chromatography B*. 2022;1191:123118. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123118.
14. Zhang R., Li P., Zhou J., Guo P., Liu Y., Shi S. A novel, simple and reliable method for the determination of hydronidone and its metabolites M3 and M4 in human plasma and urine by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in health Chinese subjects. *Analytical Biochemistry*. 2022;655:114842. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114842.
15. Ligacheva A. A., Danilets M. G., Trofimova E. S. T., Shershtoboev E. Yu., Zhdanov V. V., Guriev A. M., Belousov M. V., Yusubov M. S., Korzh A. P., Krivoshchekov S. V., Dygai A. M. Effects of Water-Soluble Polysaccharides with Different Chemical Structure, Isolated from *Acorus calamus* L. and *Trifolium pratense* L., on Nitric Oxide Production: A Screening Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;160(3):330–335. DOI: 10.1007/s10517-016-3163-2.
16. Bartella L., Bouza M., Rocío-Bautista P., Di Donna L., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. Direct wine profiling by mass spectrometry (MS): A comparison of different ambient MS approaches. *Microchemical Journal*. 2022;179:107479. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107479.
17. Moreira M., Guido L., Cruz J., Barros A. Determination of galacturonic acid content in pectin from fruit juices by liquid chromatographydiode array detection-electrospray

- ionization tandem mass spectrometry. *Open Chemistry*. 2010;8(6):1236–1243. DOI: 10.2478/s11532-010-0101-4.
- Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
 - Гугля Е. Б. Применение жидкостной хромато-масс-спектрометрии в доклинических исследованиях лекарственных веществ. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2014;1:65–71.
 - Fan B., Li T., Song X., Wu C., Qian C. A rapid, accurate and sensitive method for determination of monosaccharides in different varieties of *Osmanthus fragrans* Lour by pre-column derivatization with HPLC-MS/MS. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125:221–231. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.033.
 - Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
 - Ковалёв Г. И., Золотарёв Ю. А., Дадаян А. К., Шрам С. И., Абдуллина А. А., Васильева Е. В., Колыванов Г. Б., Жердев В. П. Изучение фармакокинетики [³H]-циклопролил-глицина в крови крыс. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2018;3:48–56. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10024.
 - Мирошниченко И. И. Основы фармакокинетики. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2002. 192 с.
 - Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
 - Лакин Г. Ф. Биометрия. 4-е издание. М.: Высшая школа; 1990. 352 с.
 - Guriyev A. M., Belousov M. V., Yusubov M. S., Akhmedzhanov R. R., Zuyeva E. P., Lopatina K. A. The investigation of acute toxicity of water-soluble polysaccharides extracted from calamus root (*Acorus calamus* L.). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2010;9(1):36–39. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2010-1-36-39.
 - Lopatina K. A., Razina T. G., Zueva E. P., Krylova S. G., Guriyev A. M., Amosova E. N., Rybalkina O. Yu., Safonova E. A., Efimova L. A., Belousov M. V. Preclinical study of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane from rhizomes *Acorus calamus* L. in cancer experiment. *Siberian journal of oncology*. 2015;1:59–63. (In Russ.)
 - Lopatina K. A., Guriyev A. M., Razina T. G., Amosova E. N., Krylova S. G., Shilova N. V., Zueva E. P. Influence of polysaccharides from *Acorus calamus* rhizomes on functional activity of murine lymphnode cells after experimental tumor chemotherapy. *Siberian journal of oncology*. 2006;3(19):59–63. (In Russ.)
 - Safonova E. A., Guriyev A. M., Razina T. G., Zueva E. P., Efimova L. A., Lopatina K. A. Increase of chemotherapy efficiency by means of fractions isolated from polysaccharides complex *Acorus calamus* L. *Russian Journal of Biotherapy*. 2012;11(4):55–58. (In Russ.)
 - Mugale M. N., Dev K., More B. S., Mishra V. S., Washimkar K. R., Singh K., Maurya R., Kumar Rath S., Chattopadhyay D., Chattopadhyay N. A Comprehensive Review on Preclinical Safety and Toxicity of Medicinal Plants. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*. 2024;4(1):100129. DOI: 10.1016/j.ccmp.2024.100129.
 - Namdari R., Jones K., Chuang S. S., Van Cruchten S., Dincer Z., Downes N., Mikkelsen L. F., Harding J., Jäckel S., Jacobsen B., Kinyamu-Akunda J., Lortie A., Mhedhbi S., Mohr S., Schmitt M. W., Prior H. Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105029. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105029.
 - Guriyev A. M., Belousov M. V., Akhmedzhanov R. R., Yusubov M. S., Churin A. A., Karpova G. V. An investigation of the introduction of water-soluble polysaccharides calamus root (*Acorus calamus* L.) effect on the experimental animals functions. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2010;9(6):18–23. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2010-6-18-23.
 - Nesterkina M., Bilokon S., Aliksieieva T., Kravchenko I., Hirsch A. K. H. Genotoxic and mutational potential of monocyclic terpenoids (carvacrol, carvone and thymol) in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Reports*. 2023;10:327–333. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.02.009.
 - De Oliveira Dos Santos A. M., Duarte A. E., Costa A. R., da Silva A. A., Rohde C., Silva D. G., de Amorim É. M., da Cruz Santos M. H., Pereira M. G., Deprá M, de Santana S. L., da Silva Valente V. L., Teixeira C. S. Canavalia ensiformis lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;222(B):2823–2832. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061.
 - Neupokoeva O. V., Lopatina K. A., Voronova O. L., Safonova E. A., Zueva E. P., Churin A. A. Mutagenic characteristics research $\alpha(1,2)$ -1-ramno- $\alpha(1,4)$ -d-galactopiranosiluronan *Acorus calamus* L. *Pacific Medical Journal*. 2015;(2):22–23. (In Russ.)
 - Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Moscow: Grif i K; 2013. 944 p. (In Russ.)
 - Miroshnichenko I. I., Kravtsova O. Yu. Organizing of pharmacokinetic investigations. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2021;(3):12–19. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
 - Wu W., Li K., Zhao C., Ran X., Zhang Y., Zhang T. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of luteolin, resveratrol and their metabolites in rat plasma and its application to pharmacokinetic interaction studies. *Journal of Chromatography B*. 2022;1191:123118. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123118.
 - Zhang R., Li P., Zhou J., Guo P., Liu Y., Shi S. A novel, simple and reliable method for the determination of hydro-nidone and its metabolites M3 and M4 in human plasma and urine by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in health Chinese subjects. *Analytical Biochemistry*. 2022;655:114842. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114842.

REFERENCES

15. Ligacheva A. A., Danilets M. G., Trofimova E. S. T., Shershtoboev E. Yu., Zhdanov V. V., Guriev A. M., Belousov M. V., Yusubov M. S., Korzh A. P., Krivoshchekov S. V., Dygai A. M. Effects of Water-Soluble Polysaccharides with Different Chemical Structure, Isolated from *Acorus calamus* L. and *Trifolium pratense* L., on Nitric Oxide Production: A Screening Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;160(3):330–335. DOI: 10.1007/s10517-016-3163-2.
16. Bartella L., Bouza M., Rocío-Bautista P., Di Donna L., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. Direct wine profiling by mass spectrometry (MS): A comparison of different ambient MS approaches. *Microchemical Journal*. 2022;179:107479. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107479.
17. Moreira M., Guido L., Cruz J., Barros A. Determination of galacturonic acid content in pectin from fruit juices by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Open Chemistry*. 2010;8(6):1236–1243. DOI: 10.2478/s11532-010-0101-4.
18. Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
19. Guglya E. B. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry application in drug discovery and preclinical study. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2014;1:65–71. (In Russ.)
20. Fan B., Li T., Song X., Wu C., Qian C. A rapid, accurate and sensitive method for determination of monosaccharides in different varieties of *Osmanthus fragrans* Lour by pre-column derivatization with HPLC-MS/MS. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125:221–231. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.033.
21. Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
22. Kovalev G. I., Zolotarev Yu. A., Dadayan A. K., Shram S. I., Abdullina A. A., Vasileva E. V., Kolyvanov G. B., Zherdev V. P. The Study of [³H]-Cyclopropylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;(3):48–56. (In Russ.) DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10024.
23. Miroshnichenko I. I. Fundamentals of pharmacokinetics. Moscow: GEOTAR-Media; 2002. 192 p. (In Russ.)
24. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
25. Lakin G. F. Biometrics. 4th edition. Moscow: Vysshaya shkola. 1990. 352 p. (In Russ.)