

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВISSN 2305-2066 (Print)  
ISSN 2658-5049 (Online)

RESEARCH &amp; PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT &amp; REGISTRATION



СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

ЦФА | центр  
фармацевтической  
аналитики



ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2020)

#### Основными видами деятельности центра являются:

- биоаналитические исследования (аналитический этап исследований биоэквивалентности, доклинических исследований и 1 фазы клинических исследований) хими-ко-фармацевтических лекарственных средств, нано-препаратов и препаратов-биоаналогов;
- сравнительный тест кинетики растворения (моделирование высвобождения лекарственных средств в желудочно-кишечном тракте в условиях *in vitro*);
- статистическая обработка результатов биоаналитических исследований и описание фармакокинетики препаратов;
- разработка, валидация и апробация методик анализа лекарственных средств



#### Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- проведение СТРК (сравнительного теста кинетики растворения)



ООО «ЦФА»  
117246, город Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел.: +7 (499) 281-81-11  
www.cpha.ru E-mail: info@cpha.ru

Система менеджмента ООО «ЦФА» сертифицирована по требованиям стандартов: GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра, свидетельство Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт), № Сертификата 19.1198.026 от 18 июля 2019 г. Сертификат действителен до 3 августа 2022 г.; ГОСТ Р ИСО 9001:2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации), № Сертификата 18.1497.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г.; международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet, № Сертификата 18.1498.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г. Область сертификации: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение СТРК (сравнительного теста кинетики растворения), определение противолечных антител к биологическим лекарственным препаратам.

**НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ**

**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**



При поддержке  
ФБУ «ГИЛС и НП»



**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Научно-производственный журнал

**2019. Том 8, № 4**

**RAZRABOTKA I REGISTRACIÂ LEKARSTVENNYH SREDSTV**

**DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION**

Research & production journal

**2019. Volume 8, No. 4**

## Цели и задачи журнала

Научно-производственный рецензируемый журнал «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения. **Первый** раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств, **второй** – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования – до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов. **Третий** раздел описывает аналитические методики контроля качества; **четвертый** раздел посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований; в **пятом** разделе рассматриваются вопросы валидации методики, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

## Редакционная коллегия

### Главный редактор

Шохин И. Е., д.фарм.н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», Москва, Россия

## Редакционная коллегия

Аммур Ю. И., к.биол.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Белоусов М. В., профессор, д.фарм.н., заведующий кафедрой фармации ФПК и ППС ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Боян Салия, Assist. Professor, PhD, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Белград, Сербия

Василенко И. А., проф., д.х.н., профессор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Хуторянский В. В., к.х.н., Prof., BSc MSc PhD MRSC, School of Pharmacy, University of Reading, Рединг, Великобритания

Гузев К. С., д.ф.н., уполномоченное лицо АО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», Москва, Россия

Гусаров Д. А., к.х.н., руководитель группы экспериментального биотехнологического производства Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Демина Н. Б., проф., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Емшанова С. В., д.фарм.н., начальник отдела научных разработок ЦКП (НОЦ) ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Комаров Т. Н., к.фарм.н., старший химик-аналитик ООО «ЦФА», Москва, Россия

Кулинич Ю. И., к.фарм.н., эксперт 1 категории ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Макеев О. Г., проф., д.м.н., зав. кафедрой биологии и медицинской генетики УГМУ, Екатеринбург, Россия

Малашенко Е. А., к.фарм.н., ст.преп. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Медведев Ю. В., к.фарм.н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Мельников Е. С., к.фарм.н., старший научный сотрудник ЦКФ ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Мустафин Р. И., к.фарм.н., директор Института фармации ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Республика Татарстан

Оборотова Н. А., проф., д.фарм.м., НИМЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Попов В. В., проф., д.м.н., зав. лабораторией профессиональной клинической фармакодинамики НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва, Россия

Русинов В. Л., чл. корр. РАН, д.х.н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Скорик Ю. А., доц., к.х.н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Сливкин А. И., проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

## Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal «**Drug development & registration**» (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal «Drug development & registration» (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization. The **first** section is devoted to the research and development of new medicines, the **second** one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development. The **third** section describes analytical quality control methods; the **fourth** section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies. The **fifth** section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

## Editorial board

### Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC Center of Pharmaceutical Analytics (ООО Center of Pharmaceutical Analytics/ООО «СРФА»), Moscow, Russia

## Editorial board

Yulia I. Ammour, Cand. of Sci. (Biol.), Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow, Russia

Mikhail V. Belousov, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Boyan R. Calija, as. Prof., PhD (Serbia), University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Ivan A. Vasilenko, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Vitaliy V. Khutoryanskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.) (UK), University of Reading, Reading, United Kingdom

Konstantin S. Guzev, Retinoid Company, Dr. of Sci. (Pharm.), Moscow, Russia

Dmitriy A. Gusarov, MIREA – Russian Technological University (RTU MIREA), Dr. of Sci. (Chem.), Moscow, Russia

Natalia B. Diomina, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Svetlana V. Emshanova, Dr. of Sci. (Pharm.), RUDN University, Moscow, Russia

Timofey N. Komarov, Cand. of Sci. (Chem.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Julia I. Kulinich, Cand. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Oleg G. Makeev, Prof., Dr. of Sci. (Med.), The Central Research Laboratory of the Ural Medical University, Yekaterinburg, Russia

Evgeniya A. Malashenko, Cand. of Sci. Pharm., Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev, Cand. of Sci. (Pharm.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), Moscow, Russia

Rouslan I. Moustafine, Cand. of Sci. (Pharm.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan

Natalia A. Oborotova, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Vladimir V. Popov, Prof., Dr. of Sci. (Med.), Joint Stock Company «Russian Railways», Moscow, Russia

Vladimir L. Rusinov, RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Yury A. Skorik, Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds, Saint-Petersburg, Russia

Aleksei I. Slivkin, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

**Смехова И. Е.**, профессор кафедры технологии лекарственных форм. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия  
**Станишевский Я. М.**, д.х.н., проф., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия  
**Сукоян Г. В.**, д.б.н., Международный центр внедрения новых биомедицинских технологий, Тбилисский государственный университет имени Ивана Джавахишвили, Тбилиси, Грузия  
**Сысоев Б. Б.**, профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия  
**Ташлицкий В. Н.**, к.х.н., старший научный сотрудник кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
**Тринеева О. В.**, д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия  
**Чучалин В. С.**, д.фарм.н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия  
**Эпштейн Н. А.**, к.х.н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

#### Учредители печатной версии

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (Сеченовский Университет)  
Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

#### Учредители онлайн версии

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

#### Издатель

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

**Директор журнала**  
Кульджанова Н. В.

**Заведующий редакцией**  
Михайлова Н. С.

**Дата выхода в свет журнала:** ноябрь 2012 г.

**Журнал выходит периодичностью 4 раза в год**

**Адрес редакции**  
Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. Тел.: +7 (499) 281-81-11  
[www.pharmjournal.ru](http://www.pharmjournal.ru) e-mail: [info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)

**Отпечатано в типографии**  
ООО «МАКС ПРЕСС», Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103

**Журнал зарегистрирован в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ)**

**Свидетельство о регистрации:**  
СМИ ЭЛ № ФС77-75437 от 01.04.2019 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

**Префикс DOI:** 10.33380/2305-2066

**Тираж** 999 экземпляров

**Условия распространения материалов:**  
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

**Свободная цена**

**Irina E. Smekhova**, Dr. of Sci. (Pharm.), Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

**Yaroslav M. Stanishevskiy**, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

**Galina V. Sukoyan**, Dr. of Sci. (Biol.) (Georgia), International Centre of Introduction of New Biomedical Technology, Tbilisi, Georgia

**Boris B. Sysuev**, as. Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

**Vadim N. Tashlitsky**, Cand. of Sci. (Chem.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Ol'ga V. Trineeva**, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

**Vladimir S. Chuchalin**, Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

**Naum A. Epshtein**, Cand. of Sci. (Chem.), Irvin-2 Company, Moscow, Russia

#### Print version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
(Sechenov University)

Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Siberian State Medical University

Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

#### Online version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

#### Publisher

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

**Journal director**  
Natalia V. Kuldjanova

**Managing Editor**  
Nadezhda S. Mikhaylova

**Date of publication of the magazine:** November 2012

**The journal is published at intervals of 4 times a year**

#### Editorial office address

20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia. Tel.: +7 (499) 281-81-11  
[www.pharmjournal.ru](http://www.pharmjournal.ru) e-mail: [info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)

#### Printing office

LLC «MAX PRESS», 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia

**Journal is registered in Russian index of scientific citation**

#### Registration certificate:

EL Media No. FS77-75437 dated 01.04.2019 issued by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technologies and Mass Communications

**DOI prefix:** 10.33380 / 2305-2066

**Circulation:** 999 copies

#### Content distribution terms:

Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License

**Free Price**

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

## Содержание

## Contents

|                                                                                                                                                                                                 |           |                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>От редакции</b>                                                                                                                                                                              | <b>5</b>  | <b>Introduction</b>                                                                                                                                                                                   |
| <b>Мероприятия</b>                                                                                                                                                                              | <b>6</b>  | <b>Events</b>                                                                                                                                                                                         |
| <b>Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»</b>                                                                                                                                  |           | <b>«Research and development of new drug products» part</b>                                                                                                                                           |
| Н. А. Мазуркова, М. А. Проценко, Е. И. Филиппова,<br>Т. А. Кукушкина, Г. И. Высочина, И. Е. Лобанова,<br>О. Ю. Мазурков, Л. Н. Шишкина, А. П. Агафонов                                          | <b>9</b>  | Natalya A. Mazurkova, Mariya A. Protsenko, Ekaterina I. Filippova,<br>Tatyana A. Kukushkina, Galina I. Vysochina, Irina E. Lobanova,<br>Oleg Yu. Mazurkov, Larisa N. Shishkina, Alexander P. Agafonov |
| Исследование противовирусной активности<br>экспериментальных образцов препаратов, полученных<br>из травы и корней <i>Alchemilla vulgaris</i> L. в отношении вирусов<br>осповакцины и оспы мышей |           | Investigation of the Antiviral Activity of Experimental<br>Samples Obtained from the Grass and Roots<br>of <i>Alchemilla vulgaris</i> L. Against Vaccinia Virus<br>and Ectromelia Virus               |
| <b>Раздел «Фармацевтическая технология»</b>                                                                                                                                                     |           | <b>«Pharmaceutical Technology» part</b>                                                                                                                                                               |
| М. С. Сокурено, С. П. Кречетов, С. А. Олифер,<br>И. И. Краснюк, Н. Л. Соловьёва, М. А. Макаренко,<br>Н. Б. Демина                                                                               | <b>16</b> | Mariya S. Sokurenko, Sergei P. Krechetov, Sofia A. Olifer,<br>Ivan I. Krasnyuk, Natalia L. Solovyova, Mariya A. Makarenko,<br>Natalia B. Demina                                                       |
| Разработка состава и технологии капсул<br>с ресвератролом                                                                                                                                       |           | Development of Composition and Technology<br>of Resveratrol Capsules                                                                                                                                  |
| С. А. Рожнова, А. В. Цыпкина                                                                                                                                                                    | <b>20</b> | Svetlana A. Rozhnova, Anastasia V. Tsyapkina                                                                                                                                                          |
| Анализ возможности применения принципа QbD к процессу<br>разработки лекарственных средств<br>на отечественных фармацевтических предприятиях                                                     |           | Comparative Analysis of the QbD Approach<br>in the Pharmaceutical Industry                                                                                                                            |
| А. В. Бондарев, Е. Т. Жиликова, Н. Б. Демина,<br>Е. Ю. Тимошенко                                                                                                                                | <b>27</b> | Alexander V. Bondarev, Elena T. Zhilyakova, Natalya B. Demina,<br>Elena Yu. Timoshenko                                                                                                                |
| Перспективы использования медицинских глин (обзор)                                                                                                                                              |           | Prospects for the Use of Medical Clays (Review)                                                                                                                                                       |
| К. С. Гузев                                                                                                                                                                                     | <b>32</b> | Konstantin S. Guzev                                                                                                                                                                                   |
| Реальные условия работы фармацевтов-служащих<br>в начале XX в. (обзор)                                                                                                                          |           | Real Work Conditions of Pharmaceutic Servants at the Beginning<br>of the XX Century (Review)                                                                                                          |
| <b>Раздел «Методы анализа лекарственных средств»</b>                                                                                                                                            |           | <b>«Analytical Methods» part</b>                                                                                                                                                                      |
| Н. В. Чебышев, А. В. Стреляева, Д. И. Лежава,<br>А. Н. Луферов, Н. В. Бобкова, Н. В. Карташова,<br>Р. М. Кузнецов                                                                               | <b>38</b> | Nikolay V. Chebyshev, Angelina V. Strelyaeva, Dianos I. Lezhava,<br>Alexander N. Luferov, Natalya V. Bobkova, Natalya V. Kartashova,<br>Roman M. Kuznetsov                                            |
| Изучение лекарственного растительного сырья грецкого ореха                                                                                                                                      |           | Investigation of Walnut Herbal Drug Raw Material                                                                                                                                                      |
| О. В. Тринеева                                                                                                                                                                                  | <b>48</b> | Olga V. Trineeva                                                                                                                                                                                      |
| Сравнительная характеристика определения<br>антиоксидантной активности плодов облепихи<br>крушиновидной различными методами                                                                     |           | Comparative Characteristics of Determination<br>of Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Fruits<br>by Various Methods                                                                                 |
| <b>Раздел «Доклинические и клинические исследования»</b>                                                                                                                                        |           | <b>«Preclinical and clinical study» part</b>                                                                                                                                                          |
| Т. Н. Комаров, М. В. Белова, Д. Д. Столярова,<br>И. Е. Шохин, Д. С. Богданова, О. А. Мискив,<br>Ю. В. Медведев, И. М. Коренская                                                                 | <b>53</b> | Timofey N. Komarov, Maria V. Belova, Daria D. Stolyarova,<br>Igor E. Shohin, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv,<br>Yuri V. Medvedev, Irina M. Korenskaya                                              |
| Химико-токсикологический анализ антиретровирусных<br>препаратов                                                                                                                                 |           | Chemical and Toxicological Analysis of Antiretroviral Drugs                                                                                                                                           |
| Т. Н. Комаров, Д. С. Богданова, О. А. Мискив,<br>А. В. Алешина, И. Е. Шохин, Ю. В. Медведев,<br>Н. С. Багаева, И. М. Коренская                                                                  | <b>61</b> | Timofey N. Komarov, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv,<br>Alexandra V. Aleshina, Igor E. Shohin, Yuri V. Medvedev,<br>Natalia S. Bagaeva, Irina M. Korenskaya                                         |
| Разработка и валидация методики количественного<br>определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и<br>гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС                               |           | Development and Validation of Salbutamol, Bromhexine,<br>Ambroxol and Guaiifenesin Determination in Human Plasma by<br>HPLC-MS/MS Method                                                              |



**Государственный институт лекарственных средств  
и надлежащих практик и Центр Фармацевтической аналитики  
приглашают принять участие  
в научно-практической конференции**

**«РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.  
ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПО ПРАВИЛАМ ЕАЭС»**

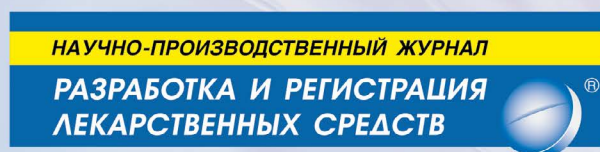
**06 декабря 2019 г. в 10.30-16.00  
Москва, АО «Технопарк Слава» (Научный проезд, д. 20, стр. 2)**

**Уважаемые читатели!**

Приглашаем Вас принять участие в конференции **«Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследования препаратов по правилам ЕАЭС»**, которую организует ООО «ЦФА».

Конференция **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** – это не только обсуждение актуальных аспектов аналитических, доклинических и клинических исследований по правилам ЕАЭС, но и площадка для встреч, дискуссий и неформального общения специалистов сферы обращения лекарственных средств. Докладчиками конференции являются ведущие специалисты отрасли, представляющие научные организации, регуляторные органы и промышленность.

**Со-организаторы и партнёры:**



**ERWEKA**

*Регистрация участников с 10:30 до 11:00.*

**Участие бесплатное! Количество мест ограничено (не более 100 слушателей)!**

**Программа конференции будет представлена на сайте [pharmjournal.ru](http://pharmjournal.ru) в ближайшее время**

**Контакты:** e-mail: [info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)

## IX МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПАРТНЕР-ФОРУМ «LIFE SCIENCES INVEST. PARTNERING RUSSIA»

7–8 ноября в Талион Империял отеле прошел IX Международный форум «Life Sciences Invest. Partnering Russia». В этом году мероприятие собрало более 700 участников. В сессиях приняло участие более 200 спикеров.



Накануне открытия Форума, 6 ноября 2019 года, состоялось торжественное открытие научно-технологического центра (НТЦ) компании «НТФФ «ПОЛИСАН» – уникальной площадки для разработки инновационных отечественных лекарственных средств, оснащенной самым современным оборудованием для применения передовых научных технологий.

Открытие центра позволит вывести процесс разработки отечественных инновационных лекарственных препаратов на новый уровень. В церемонии открытия принимали участие вице-губернатор Санкт-Петербурга **Евгений Елин**, председатель комитета по промышленной политике, инновациям и торговле Санкт-Петербурга **Юрий Калабин**, генеральный директор ООО «НТФФ «ПОЛИСАН» **Александр Борисов**, директор по науке ООО «НТФФ «ПОЛИСАН» **Алексей Коваленко**.

Девятый форум стал рекордным по количеству заявленных тем. Спектр традиционно обсуждаемых вопросов в сфере наук о жизни в этом году впервые был продолжен актуальными вопросами пищевой промышленности. Представители федеральных и городских органов власти, руководители компаний и образовательных учреждений, ведущие специалисты обсуждали развитие системы здравоохранения, фармацевтической, парфюмерно-косметической, пищевой и смежных отраслей промышленности, включая разработку концепции кадровой политики Кластера медицинской, фармацевтической промышленности и радиационных технологий Санкт-Петербурга. Спикеры мероприятия представили аналитику рынка, подвели предварительные итоги 2019 года и рассказали о перспективах развития отраслей.

Темой стартового мероприятия – пресс-завтрака – стало развитие промышленной политики Санкт-Петербурга в области пищевых технологий. На нем эксперты поделились планами о преобразованиях, которые смогут повысить качество жизни и благополучие петербуржцев. На сессии «Внедрение новых принципов лекарственного обеспечения» спикеры оказались практически единогласны во мнении о необходимости кардинальных изменений в законодательстве в сфере лекарственного обеспечения.

В этом году форум поддерживали компании из разных отраслей рынка. Всего в мероприятиях форума приняло участие 150 компании из Санкт-Петербурга, Москвы, других городов России, а также из Финляндии, Германии, Китая, Казахстана.

На сессии «Развитие кадрового потенциала фармацевтической отрасли» **Мария Петрова**, руководитель отдела персонала ЗАО «БИОКАД» поделилась практическими решениями в вопросах кадровой политики, принятой в компании, представив стратегию развития нового поколения научных и производственных кадров.

Более двух часов обсуждались вопросы внедрения эффективных систем управления качеством, успешная подготовка препарата к выводу на рынки ЕАЭС и ЕС, перспективы развития Real World Evidence в России на круглом столе «Клинические исследования. Перспективы развития отрасли в условиях перехода к единому рынку ЕАЭС». Специалисты компании X7 Research рассказали о надлежащей практике фармаконадзора в РФ и ЕАЭС, внедрении эффективных систем управления качеством. Представители X7 Clinical Research расска-

зали о критериях эффективного взаимодействия исследовательского центра и CRO.

На тематической сессии «Современное состояние и вектор развития геномных технологий в России. Перспективы создания отечественных биомедицинских клеточных продуктов и препаратов для генной терапии» эксперты говорили о последних достижениях отечественной и зарубежной науки в области полногеномного секвенирования, редактирования ДНК и создания модифицированных клеточных продуктов.

Очень предметной и интересной стала сессия партнера – компании «Фармимэкс» «Развитие рынка орфанных лекарственных препаратов», модерировала встречу **Инга Нижарадзе**, вице-президент компании. В ходе дискуссии экспертное сообщество отметило несколько ключевых точек, необходимых для повышения лекарственного обеспечения пациентов. В частности, предлагается выделить в системе лекарственного обеспечения отдельный сегмент орфанных препаратов ввиду специфики их регистрации, ценообразования и допуска на рынок. Также необходимо разработать нормативно-правовую базу, совершенствующую порядок лекарственного обеспечения, с учетом интеграции в существующую систему обращения лекарственных средств.

Впервые в истории форума, в рамках тематической сессии «Реализация федерального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями», проведена телеконференция. Российские специалисты с коллегами из Германии обсудили проблемы с обеспечением противоопухолевыми препаратами.

Создание Парка живых систем (Life Sciences Park) в Технопарке Петербурга и развитие приграничного сотрудничества с Финляндией рассмотрели на международной сессии.

Отдельным треком «Life Sciences Invest» стала тема развития пищевых технологий. Эксперты обсудили новый вектор развития промышленной политики Петербурга, говорили о добросовестной конкуренции и мерах по контролю качества продуктов.

В сессии «Добросовестная конкуренция и меры по контролю качества в пищевой промышленности» поднимались вопросы оценки и контроля показателей качества и безопасности пищевой продукции.

На круглом столе «Развитие кадрового потенциала пищевой индустрии: вызовы и перспективы» руководители образовательных учреждений выразили желание и готовность сотрудничать с пищевой отраслью.

В рамках круглого стола «Подходы к организации доклинических исследований статуса GLP» объединились ведущие специалисты в области экспериментальной медицины, доклинических ис-



следований и ветеринарного надзора. Была обозначена необходимость повышения доли отечественного производства ветеринарных препаратов, уровня доверия к испытательным центрам, необходимость внедрения риск-ориентированного подхода при их аудите и подчеркнута, что требования GLP ЕАЭС не предусматривают необходимости лицензирования доклинических исследований как вида деятельности и подготовки инспектората GLP. Качественное планирование доклинических исследований – залог снижения экономических рисков при дальнейшей разработке препарата.

Завершился форум празднованием столетия химико-фармацевтического университета. В Государственной академической капелле состоялось торжественное расширенное заседание Ученого совета СПГХФУ. С юбилеем преподавателей и студентов поздравила выпускница ВУЗа **Валентина Матвиенко**, председатель Совета Федерации РФ. Государственные и ведомственные награды вручили сотрудникам университета, а студенты и преподаватели представили творческую программу.

«В этом году нам удалось собрать самый представительный форум и организовать качественную, полную деловую программу, которая позволит сделать еще один шаг к развитию не только фармацевтического рынка. К нам приехало большое количество спикеров – ученых с мировым именем, представителей исполнительной и законодательной власти, регулирующих отрасль. Одной из тем, обсуждаемых на LSI, стал следующий этап развития промышленной политики и фокус на инвестициях в пищевую промышленность. Таким образом, делается еще один шаг к формированию в России единой системы регулирования, к которой будут относиться продукты питания, ветеринарные препараты, лекарственные препараты для медицинского применения и парфюмерно-косметическая продукция. Это наша цель на ближайшие годы», – подвел итоги LSI Дмитрий Чагин, директор Союза «Медико-фармацевтические проекты. XXI век».

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



Медиа-партнерство



**Наше издание приглашает к сотрудничеству специалистов и экспертов фармацевтического рынка, задействованных в сфере разработки и производства лекарственных средств, а также производителей сырья, материалов и оборудования, необходимого для оснащения лабораторных комплексов и производственных объектов.**

**В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:**

➤ Публикации в печатном и электронном журнале

- Научные статьи
- Рекламные статьи
- Рекламные модули

➤ Баннерная реклама на сайте

Размещение рекламных баннеров на сайте  
[pharmjournal.ru](http://pharmjournal.ru)

➤ Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала

➤ e-mail маркетинг (в базе 16500 адресов)

➤ Участие в качестве спикера/экспонента в конференциях, организуемых нашим изданием

О журнале



**Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:**

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования до создания стандартных и терапевтически эффективных ЛС.
- ✓ Аналитические методики контроля качества.
- ✓ Подходы к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований.
- ✓ Валидация методик, подготовка регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении.



Включен в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.  
Редакция ведет работу по включению журнала в список цитирования SCOPUS.

**Научный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» является партнером ключевых мероприятий фармацевтической отрасли:**



- ✓ Фармацевтический форум стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российский Фармацевтический Форум.
- ✓ GMP-конференция с международным участием.
- ✓ Дженерики и биосимиляры в России и ЕАЭС.
- ✓ IPHEB Russia.
- ✓ И других не менее значимых мероприятий.

**По вопросам информационного сотрудничества  
просьба обращаться по электронной почте  
[info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru); [pharmjournalru@gmail.com](mailto:pharmjournalru@gmail.com)  
или по телефону +7 977 781 86 18**

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15>  
УДК 578.832; 582.734; 615.281



Оригинальная статья/Research article

## Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей

Н. А. Мазуркова<sup>1</sup>, М. А. Проценко<sup>1\*</sup>, Е. И. Филиппова<sup>1</sup>, Т. А. Кукушкина<sup>2</sup>, Г. И. Высочина<sup>2</sup>, И. Е. Лобанова<sup>2</sup>, О. Ю. Мазурков<sup>1</sup>, Л. Н. Шишкина<sup>1</sup>, А. П. Агафонов<sup>1</sup>

1 – ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор»), 630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово  
2 – ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

\*Контактное лицо: Проценко Мария Анатольевна. E-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru

Статья получена: 11.10.2019. Статья принята к печати: 18.11.2019

### Резюме

**Введение.** Отмена вакцинации против натуральной оспы после ее ликвидации в 1980 году привела к снижению противооспенного иммунитета у людей. Близкие по структуре к вирусу натуральной оспы зоонозные вирусы оспы обезьян, верблюдов, буйволов и коров тоже представляют опасность для человека. В России на сегодняшний день отсутствуют эффективные и безопасные лекарственные средства для профилактики и лечения натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека и животных. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris*) является перспективным источником для разработки новых противовирусных препаратов. Проведенные ранее исследования показали, что водные растворы сухого этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней *Alchemilla vulgaris* проявляют активность в отношении вируса гриппа и вируса простого герпеса.

**Цель.** Цель данной работы заключалась в исследовании химического состава и противовирусной активности экстрактов из корней и травы *Alchemilla vulgaris* в отношении ортопоксвирусов.

**Материалы и методы.** Качественный анализ образцов экстрактов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Количественный анализ проводили, используя комплекс спектрофотометрических методов. Определение токсичности и противовирусной активности препаратов на основе *Alchemilla vulgaris* *in vitro* проводили на перевиваемой культуре клеток Vero. Противовирусную активность полученных препаратов оценивали по снижению инфекционности (титра) ортопоксвирусов в монослое клеток Vero, зараженных ортопоксвирусами в присутствии препаратов с различной концентрацией, относительно культуры клеток, зараженной ортопоксвирусами без препаратов.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что образец препарата, полученный методом этилацетатного извлечения из корней исследуемого растения и очищенный хлороформом, содержит в основном катехины и лейкоантоцианы (70 %). В то же время очищенный хлороформом этанольный экстракт из сырой массы травы растения содержит сумму флавоноидов (71 %). При этом содержание флавоноидов в неочищенных этанольных экстрактах из корней и травы *Alchemilla vulgaris* составляло 5 % и 6 % соответственно. Выявлено, что противовирусную активность в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей проявили очищенные препараты, полученные из корней *Alchemilla vulgaris* при использовании в качестве экстрагента этилацетата, а также препараты, полученные из травы путем этанольного извлечения.

**Заключение.** Таким образом, очищенные этилацетатные экстракты из корней и этанольные экстракты из сырой массы травы *Alchemilla vulgaris* проявляют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Alchemilla vulgaris*, флавоноиды, катехины, лейкоантоцианы, вирус осповакцины, вирус оспы мышей.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Н. А. Мазуркова, Л. Н. Шишкина и А. П. Агафонов провели статистическую обработку и интерпретацию результатов, М. А. Проценко и Т. А. Кукушкина получили экстракты *Alchemilla vulgaris*, Е. И. Филиппова и О. Ю. Мазурков определили токсичность и противовирусную активность экстрактов, Г. И. Высочина и И. Е. Лобанова провели качественный и количественный анализ экстрактов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Мазуркова Н. А., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 9–15.

## Investigation of the Antiviral Activity of Experimental Samples Obtained from the Grass and Roots of *Alchemilla vulgaris* L. Against Vaccinia Virus and Ectromelia Virus

Natalya A. Mazurkova<sup>1</sup>, Mariya A. Protsenko<sup>1</sup>, Ekaterina I. Filippova<sup>1</sup>, Tatyana A. Kukushkina<sup>2</sup>, Galina I. Vysochina<sup>2</sup>, Irina E. Lobanova<sup>2</sup>, Oleg Yu. Mazurkov<sup>1</sup>, Larisa N. Shishkina<sup>1</sup>, Alexander P. Agafonov<sup>1</sup>

1 – State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, w.v. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia  
2 – Central Siberian Botanical Garden SB RAS, 101, Zolotodolinskaya str., Novosibirsk, 630090, Russia

\*Corresponding author: Mariya A. Protsenko. E-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru

Received: 11.10.2019. Accepted: 18.11.2019

© Мазуркова Н. А., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П., 2019

© Mazurkova N. A., Protsenko M. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Lobanova I. E., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Agafonov A. P., 2019

## Abstract

**Introduction.** The abolition of smallpox vaccination after its elimination in 1980 led to a decrease in the immunocompromised immunity in humans. Zoonotic monkeypox, camelpox, buffalopox and cowpox viruses that are close to the variola virus also pose a danger to humans. In Russia today there are no effective and safe medicines for the prevention and treatment of smallpox and other orthopoxvirus infections in humans and animals. The Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris*) is a promising source for the development of new antiviral drugs. Previous studies have found that *Alchemilla vulgaris* shows activity against influenza virus and herpes simplex virus.

**Aim.** The aim of this work was to study the chemical composition and antiviral activity of extracts from the roots and the grass of *Alchemilla vulgaris* against orthopoxviruses.

**Materials and methods.** Qualitative analysis of the samples was performed by high performance liquid chromatography. Quantitative analysis was performed using a complex of spectrophotometric methods. To determine the toxicity and antiviral activity of experimental samples from *Alchemilla vulgaris in vitro*, a transplantable Vero cell culture was used. Antiviral activity of the obtained preparations was evaluated by reducing the infectivity (titer) of orthopoxviruses in the monolayer of Vero cells infected with orthopoxviruses in the presence of preparations with different concentrations relative to the cell culture infected with orthopoxviruses without the preparations.

**Results and discussion.** It was shown that the experimental sample from *Alchemilla vulgaris* obtained by the method of ethyl acetate extraction from the roots of the studied plant and purified with chloroform contains mainly catechins and leucoanthocyanins (70 %). In parallel, extract from the raw mass of the grass of the plant purified with chloroform and ethanol contains the amount of flavonoids (71 %). Wherein the content of flavonoids in unpurified ethanol extracts from the roots and the grass of *Alchemilla vulgaris* composed 5 % and 6 %, respectively. It was revealed that purified preparations obtained from *Alchemilla vulgaris* roots when using ethyl acetate and ethanol as extractants showed antiviral activity against vaccinia virus and ectromelia virus, as well as preparations obtained from grass by ethanol extraction.

**Conclusion.** Thus, purified ethyl acetate extracts from the roots and ethanol extracts from the wet grass mass of *Alchemilla vulgaris* exhibit antiviral activity against orthopoxviruses *in vitro*.

**Keywords:** *Alchemilla vulgaris*, flavonoids, catechins, leucoanthocyanins, Vaccinia virus, Ectromelia virus.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Natalya A. Mazurkova, Larisa N. Shishkina and Alexander P. Agafonov carried out statistical processing and participated in data interpretation, Mariya A. Protsenko and Tatyana A. Kukushkina received *Alchemilla vulgaris* extracts, Ekaterina I. Filippova and Oleg Yu. Mazurkov determined the toxicity and antiviral activity of the extracts, Galina I. Vysochina and Irina E. Lobanova conducted a qualitative and quantitative analysis of the extracts. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

**For citation:** Mazurkova N. A., Protsenko M. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Lobanova I. E., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Agafonov A. P. Investigation of the antiviral activity of experimental samples obtained from the grass and roots of *Alchemilla vulgaris* L. against Vaccinia virus and Ectromelia virus. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 9–15.

## ВВЕДЕНИЕ

Отмена вакцинации против натуральной оспы после ее ликвидации в 1980 году привела к снижению противооспенного иммунитета у людей. Близкие к вирусу натуральной оспы и относящиеся к тому же роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* зоонозные вирусы оспы обезьян, верблюдов, буйволов и коров представляют опасность для человека [1]. Следует также отметить, что в наше время человечество подвергается потенциальной опасности заражения оспой, преднамеренного использования против населения штаммов вируса натуральной оспы в качестве биологического оружия. Все это создает реальные предпосылки для заболевания людей оспой [2].

Кроме того, для ортопоксвирусов характерна способность приобретать устойчивость к лекарственным препаратам вследствие мутаций [2, 3]. В связи с вышесказанным, для эффективного лечения ортопоксвирусных инфекций, в том числе натуральной оспы, разработка новых противооспенных препаратов с различными механизмами антиортопоксвирусного действия остается актуальной.

13 июля 2018 г. Администрация по контролю над продуктами и лекарствами США (FDA) зарегистрировала препарат для лечения натуральной оспы – Тековиримат (Tecovirimat, TPOXX), созданный на основе ST-246 (4-трифторметил-N-

(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етено-циклопроп[ф]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) [3, 4]. На стадии клинических испытаний находится также еще один современный, эффективный и биодоступный при пероральном введении противовирусный химический препарат – CMX001 (Brincidofovir), созданный на основе препарата Cidofovir [5, 6]. Российский препарат НИОХ-14, аналогичный ST-246, находящийся в стадии доклинических исследований, также проявляет противовирусную активность в отношении вируса натуральной оспы [7].

В исследованиях *in vivo* были получены многообещающие результаты для соединений – ингибиторов тирозинкиназы, CI-1033 и Gleevec, в отношении системной ортопоксвирусной инфекции. Данные соединения не предотвращали репликацию вируса, но резко снижали высвобождение внеклеточного вируса натуральной оспы [8].

В XIX веке в Северной Америке коренные жители успешно лечили натуральную оспу экстрактами, полученными из насекомоядного растения *Sarracenia purpurea* из семейства *Sarracenaceae*. В современных научных исследованиях показано, что водно-этанольные экстракты *Sarracenia purpurea* способны эффективно ингибировать репликацию вирусов осповакцины, оспы обезьян и натуральной оспы *in vitro*, также вызванный ими цитопатический эффект [9]. Извлече-

ния, полученные из других растений (*Acacia arabica*, *Ocimum sanctum*, *Eugenia jambolana*, *Azadirachta indica*, *Opuntia streptacantha* и *Perscia vulgaris*), также проявляя активность в отношении ортопоксвирусов [10].

Манжетка обыкновенная *Alchemilla vulgaris* L. из семейства Rosaceae является перспективным источником для разработки новых противовирусных препаратов. В народной медицине манжетка применяется как противовоспалительное, вяжущее, антисептическое, ранозаживляющее, успокаивающее, мочегонное и отхаркивающее средство, при вирусных заболеваниях [11–14]. Ранее проведенные нами исследования показали, что экспериментальные образцы препаратов на основе этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней *Alchemilla vulgaris* проявляют активность в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, а также вируса гриппа [15, 16].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали измельченные корни и траву *Alchemilla vulgaris*, собранной на Семинском перевале Горного Алтая в фазу бутонизации – начала цветения в 2012 году.

**Получение водных и этанольных экстрактов из *Alchemilla vulgaris*.** Для получения сухих водных и этанольных экстрактов использовали разработанную нами ранее технологию [17]. Выход этанольного экстракта для травы и корней *Alchemilla vulgaris* составляет 30 % и 35 % соответственно.

**Получение образцов на основе суммы флавонолов из травы *Alchemilla vulgaris*.** Сырую массу травы растения экстрагировали 90–96 % этиловым спиртом. После упаривания этилового спирта добавляли дистиллированную воду и проводили очистку водного остатка хлороформом. Очищенный водный остаток экстрагировали этилацетатом, и полученный экстракт упаривали. Выход осадка составляет 1,5 % [18].

**Получение экспериментальных образцов препаратов на основе суммы флавоноидов (катехинов и лейкоантоцианов) из корней *Alchemilla vulgaris*.** Измельченные и просеянные через сито корни манжетки обыкновенной экстрагировали 50-кратным объемом этилацетата в три приема при нагревании на водяной бане с обратным холодильником по 20 минут. Объединенный этилацетатный экстракт концентрировали в ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 50 °C до остатка, превышающего в 3 раза массу сырья. Полученный экстракт вливали тонкой струей при помешивании в 6-кратно больший объем хлороформа, в котором растворяется примесь инертных веществ (смолы, пигменты и т.д.). Выпадает хлопьевидный осадок белого цвета, который отфильтровывали через воронку со стеклянным фильтром. Полученный осадок высушивали в вакууме. Высушенный продукт подвергали размолу, рассыпали

тонким слоем в затемненном месте и выдерживали до отсутствия запаха растворителя. Выход осадка составляет 5–10 % от массы сырья.

**Качественный анализ экспериментальных образцов растительных препаратов** проводили как методом хроматографии на бумаге, используя в качестве проявителя 10 % спиртовой раствор хлорида алюминия, так и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent-1200» (США) с диодноматричным детектором и системы сбора и обработки данных ChemStation. Для разделения использовали колонку Zorbax SB-C18 (Agilent, США), размером 4,6 × 150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1 %) изменялось от 50 до 52 % за 56 мин. Скорость потока элюента 1 мкл/мин. Температура колонки 26 °C. Объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование осуществляли при  $\lambda = 360$  нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос.ч.), 0,1 % ортофосфорную кислоту (ос.ч.), бидистиллированную воду. Растворы стандартных образцов готовили в концентрации 10 мкг/мл в этиловом спирте. Состав фенольных соединений определяли, сопоставляя времена удерживания пиков веществ и спектральных данных.

**Количественный анализ экспериментальных образцов растительных препаратов.** Количественное определение суммы флавонолов в пересчете на рутин проводили по методике В. В. Беликова и М. С. Шрайбер, в которой использована реакция комплексообразования флавонолов с хлоридом алюминия. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 (Россия) при  $\lambda = 415$  нм [19].

Содержание катехинов в пересчете на (+)-катехин определяли спектрофотометрическим методом при  $\lambda = 502$  нм. Методика основана на способности катехинов давать малиновое окрашивание с раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте [20].

Для определения дубильных веществ в пересчете на танин применяли реакцию с 2 % водным раствором аммония молибденовокислого. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли при  $\lambda = 420$  нм [21].

**Определение токсичности и противовирусной активности растительных препаратов *in vitro*** проводили на перевиваемой линии клеток почки зеленой марышки Vero, полученной из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Определяли максимально переносимые концентрации (МПК) образцов для данной культуры клеток. Для этого 10 мг каждого экстракта растворяли в 1 мл среды DMEM (Биолот, Россия) с 2 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия), затем разводили в 10 раз (до 1000 мкг/мл) и делали 2-кратные последовательные разведения этой же питательной средой (20 концент-

раций). После этого по 100 мкл разведений экстрактов вносили в соответствующие лунки планшета (по 4 лунки для каждой концентрации) и ставили в термостат на 4 суток при температуре 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> и 100 % влажности. Через 4 суток с помощью инвертированного микроскопа Биолам П2-1 (Россия) оценивали деструктивные изменения в монослое клеток Vero, инкубированных с разными концентрациями экстрактов. В качестве контроля использовали монослой культуры клеток Vero без экстрактов. Определяли МПК, равную концентрации экстракта, при которой сохранялось 100 % жизнеспособного монослоя клеток во всех лунках.

В экспериментах использовали полученные из отдела коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ортопоксвирусы: вирус осповакцины (BOV, штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей – экстромелии (BOM, штамм К-1). Вирусы нарабатывали в культуре клеток Vero. Концентрацию (титр) вирусов в культуральной жидкости определяли путем титрования методом бляшкообразования в чувствительной культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл). Титр вируса в используемых в работе образцах составлял от 4,8 до 5,5 lg БОЕ/мл.

Противовирусную активность препаратов на основе *Alchemilla vulgaris* оценивали по снижению инфекционности (титра) ортопоксвирусов в монослое клеток Vero, зараженных ортопоксвирусами в присутствии препаратов с различной концентрацией, относительно культуры клеток, зараженной ортопоксвирусами без препарата. В лунки 24-луночных планшетов (Costar, Германия) с клетками вносили по 0,1 мл раствора препаратов в среде DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки с разными концентрациями за 1 ч до заражения. Заражение осуществляли десятикратными разведениями вирусов (с 1-го по 6-е) на среде DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки в объеме 0,1 мл. Монослой клеток с вирусом культивировали в общем объеме питательной среды DMEM, равном 1,0 мл, содержащем 2 % эмбриональной сыворотки. Эксперименты были проведены в 4-х повторях. Через 6 суток культивирования в монослое клеток подсчитывали количество бляшек и определяли титр вирусов (в lg БОЕ/мл) в опыте и контроле (без препаратов). На основании этого рассчитывали индекс нейтрализации (ИН, в lg) вирусов:  $ИН = \frac{\text{Титр}_{\text{контроль}}}{\text{Титр}_{\text{опыт}}}$

**Статистическую обработку и сравнение результатов** осуществляли стандартными методами [22]. Показатели титров вирусов представлены как среднее значение  $\pm 95\%$ -й доверительный интервал ( $M \pm I_{95}$ ). Сравнение показателей средних значений проводили с применением непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при 95 % уровне надежности ( $p \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Препарат, выделенный методом этилацетатного извлечения из корней *Alchemilla vulgaris*, содержал в своем составе в основном катехины и лейкоантоцианы (70 %). В препарате идентифицированы (+)-катехин и галловая кислота. Содержание флавоноидов в очищенном этанольном экстракте, выделенном из сырой массы травы растения, составляло 71 %. В экстракте обнаружено не менее 30 соединений, из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (-)-катехин.

Показано, что в этанольном экстракте, полученном из сухой травы методом четырехкратной дробной мацерации, содержалось не менее 21 соединения. Идентифицированы авикулярин, (+)-катехин, галловая, гентиизиновая, феруловая кислоты и кумарин эскулетин. Суммарные количества катехинов, флавонолов и танинов в сухом экстракте составляли 0,15 %, 5,85 % и 42,0 % соответственно. При этом этанольный экстракт корней манжетки, полученный тем же методом, содержал 5 % катехинов и лейкоантоцианов. В составе экстракта обнаружен (+)-катехин.

При определении токсичности препаратов из манжетки обыкновенной в отношении клеток Vero было показано, что образцы из корней *Alchemilla vulgaris*, выделенные методом этилацетатного и этанольного извлечений, были малотоксичными для данной линии клеток, их МПК составляли 400 и 100 мкг/мл соответственно. МПК для экстрактов, полученных из травы методом этанольного извлечения, составляли 200 мкг/мл для неочищенного и 50 мкг/мл для очищенного образца. В то время как образцы, полученные из корней и травы методом водного извлечения, были более токсичными, их МПК составляли 25 мкг/мл.

Результаты изучения противовирусной активности полученных извлечений представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, противовирусный эффект в культуре клеток Vero в отношении вируса осповакцины проявили препараты, полученные из корней *Alchemilla vulgaris* при использовании в качестве экстрагентов этилацетата и 70 % этанола, а также препараты, полученные из травы растения путем этанольного извлечения.

Исследование противовирусной активности препаратов *Alchemilla vulgaris* в отношении другого вируса семейства ортопоксвирусов – вируса оспы мышей показало сходные результаты, а именно, все препараты, кроме полученных водным извлечением, обладали противовирусным действием в отношении данного вируса. Результаты представлены в таблице 2.

На основании данных представленных в таблице 2, выявлено, что наибольшую противовирусную активность проявил очищенный этилацетатный экстракт из корней растения и очищенный этанольный экстракт из сырой массы травы. Оба образца также показали самое высокое содержание флавоноидов в пересчете на сухой препарат.

**Таблица 1. Противовирусный эффект экспериментальных образцов *Alchemilla vulgaris* в культуре клеток Vero в отношении вируса осповакцины****Table 1. Antiviral effect of experimental samples from *Alchemilla vulgaris* in Vero cell culture against Vaccinia virus**

| Вид сырья       | Тип извлечения                                                                        | Концентрация<br>препарата,<br>мкг/мл | Титр вируса,<br>Ig БОЕ/мл<br>(M±I <sub>95</sub> , n = 4) | ИН<br>(Титр <sub>контроль</sub> /<br>Титр <sub>опыт</sub> ), Ig |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Корни           | Этилацетатное (очи-<br>щенное хлороформом)<br>(70 % катехинов и лейко-<br>антоцианов) | 400                                  | 2,50 ± 0,10*                                             | 3,01                                                            |
|                 |                                                                                       | 200                                  | 2,98 ± 0,24*                                             | 2,53                                                            |
|                 |                                                                                       | 100                                  | 3,34 ± 0,08*                                             | 2,17                                                            |
|                 |                                                                                       | 50                                   | 3,83 ± 0,20*                                             | 1,68                                                            |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,18 ± 0,10*                                             | 1,33                                                            |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 4,83 ± 0,25*                                             | 0,68                                                            |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
|                 | Этанольное (5 % кате-<br>хинов и лейкоантоциа-<br>нов)                                | 100                                  | 4,52 ± 0,05*                                             | 1,31                                                            |
|                 |                                                                                       | 50                                   | 5,00 ± 0,10*                                             | 0,83                                                            |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,83 ± 0,25*                                             | 0,68                                                            |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
|                 | Водное                                                                                | 25                                   | 5,18 ± 0,10*                                             | 0,65                                                            |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
| Трава           | Этанольное (очищен-<br>ное хлороформом) (71 %<br>флавоноидов)                         | 50                                   | 3,71 ± 0,20*                                             | 1,80                                                            |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,91 ± 0,24*                                             | 0,60                                                            |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,51 ± 0,05                                              | 0                                                               |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,51 ± 0,05                                              | 0                                                               |
|                 | Этанольное (6 % фла-<br>воноидов)                                                     | 200                                  | 3,83 ± 0,20*                                             | 1,68                                                            |
|                 |                                                                                       | 100                                  | 4,18 ± 0,10*                                             | 1,33                                                            |
|                 |                                                                                       | 50                                   | 4,51 ± 0,20*                                             | 1,00                                                            |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,83 ± 0,25*                                             | 0,68                                                            |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,50 ± 0,04                                              | 0,01                                                            |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
|                 | Водное                                                                                | 25                                   | 5,50 ± 0,04                                              | 0,01                                                            |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,51 ± 0,04                                              | 0                                                               |
| Контроль вируса |                                                                                       |                                      | 5,51 ± 0,04                                              | –                                                               |

**Примечание:** ИН – индекс нейтрализации;  $M$  – среднее,  $I_{95}$  – 95%-й доверительный уровень;  $n$  – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; \* – достоверное отличие от соответствующего контроля при  $p \leq 0,05$ .

Следует отметить, что при наименьшей (6,25 мкг/мл) из всех исследованных концентраций экстрактов достоверное снижение титра вируса оспы мышей в сравнении с титром этого же вируса в контроле, где вместо экстракта вносили ту же самую питательную среду, наблюдали только для препарата, полученного из корней этилацетатным извлечением.

Показано, что с увеличением концентрации всех исследованных экспериментальных образцов препаратов наблюдали снижение титров вирусов осповакцины и оспы мышей и соответственное увеличение индекса нейтрализации в отношении этих ортопоксвирусов.

**Таблица 2. Противовирусный эффект экспериментальных образцов *Alchemilla vulgaris* в культуре клеток Vero в отношении вируса оспы мышей****Table 2. Antiviral effect of experimental samples from *Alchemilla vulgaris* in Vero cell culture against Ectromelia virus**

| Вид сырья       | Тип извлечения                                                                        | Концентрация<br>препарата,<br>мкг/мл | Титр вируса, Ig<br>БОЕ/мл ( $M \pm I_{95}$ ,<br>n = 4) | ИН<br>(Титр<br>контроль<br>Титр <sub>опыт</sub> ), Ig |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Корни           | Этилацетатное (очи-<br>щенное хлороформом)<br>(70 % катехинов и лейко-<br>антоцианов) | 400                                  | 2,83 ± 0,10*                                           | 3,50                                                  |
|                 |                                                                                       | 200                                  | 3,17 ± 0,20*                                           | 2,66                                                  |
|                 |                                                                                       | 100                                  | 3,85 ± 0,08*                                           | 1,98                                                  |
|                 |                                                                                       | 50                                   | 4,14 ± 0,11*                                           | 1,69                                                  |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,50 ± 0,04*                                           | 1,33                                                  |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,00 ± 0,10*                                           | 0,83                                                  |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 4,83 ± 0,25*                                           | 0,68                                                  |
|                 | Этанольное (5 % кате-<br>хинов и лейкоантоциа-<br>нов)                                | 100                                  | 4,18 ± 0,10*                                           | 1,33                                                  |
|                 |                                                                                       | 50                                   | 4,51 ± 0,20*                                           | 1,00                                                  |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,83 ± 0,25*                                           | 0,68                                                  |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,80 ± 0,10                                            | 0,03                                                  |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,83 ± 0,25                                            | 0                                                     |
| Водное          | 25                                                                                    | 5,21 ± 0,24                          | 0,62                                                   |                                                       |
|                 | 12,5                                                                                  | 5,83 ± 0,25                          | 0                                                      |                                                       |
|                 | 6,25                                                                                  | 5,83 ± 0,25                          | 0                                                      |                                                       |
| Трава           | Этанольное (очищен-<br>ное хлороформом) (71 %<br>флавоноидов)                         | 50                                   | 3,34 ± 0,08*                                           | 2,17                                                  |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 4,32 ± 0,11*                                           | 1,51                                                  |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,18 ± 0,10*                                           | 0,65                                                  |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,83 ± 0,20                                            | 0                                                     |
|                 | Этанольное (6 % фла-<br>воноидов)                                                     | 200                                  | 4,15 ± 0,11*                                           | 1,68                                                  |
|                 |                                                                                       | 100                                  | 4,50 ± 0,04*                                           | 1,33                                                  |
|                 |                                                                                       | 50                                   | 4,83 ± 0,20*                                           | 1,00                                                  |
|                 |                                                                                       | 25                                   | 5,33 ± 0,10                                            | 0,50                                                  |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,83 ± 0,20                                            | 0                                                     |
|                 |                                                                                       | 6,25                                 | 5,83 ± 0,20                                            | 0                                                     |
|                 | Водное                                                                                | 25                                   | 5,80 ± 0,10                                            | 0,03                                                  |
|                 |                                                                                       | 12,5                                 | 5,80 ± 0,10                                            | 0,03                                                  |
| 6,25            |                                                                                       | 5,83 ± 0,20                          | 0                                                      |                                                       |
| Контроль вируса |                                                                                       | –                                    | 5,83 ± 0,20                                            | –                                                     |

**Примечание:** ИН – индекс нейтрализации;  $M$  – среднее,  $I_{95}$  – 95%-й доверительный уровень;  $n$  – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; \* – достоверное отличие от соответствующего контроля при  $p \leq 0,05$ .

При этом наибольшей антивирусной активностью в отношении и вируса осповакцины, и вируса оспы мышей обладал препарат, полученный из корней *Alchemilla vulgaris* методом этилацетатного извлечения, и препарат, полученный из сырой массы травы методом этанольного извлечения.

Стандартизация лекарственных средств является основным гарантом их высокого качества при серийном производстве и обеспечивает эффективность и безопасность применения. Важным моментом стандартизации разрабатываемых лекарственных препаратов на основе растительных источников является определение вещества или групп веществ, ответственных за фармакологическое действие этих препаратов.

Впоследствии, для достоверного установления параметров для стандартизации разрабатываемых лекарственных средств следует провести выделение групп активных соединений из растения и анализ их биологической активности.

Анализ литературных данных по фитохимическому анализу экстрактов растений, проявляющих активность в отношении поксвирусов, показал наличие алкалоидов, глюкозидов, полифенольных соединений, флавоноидов в *Eugenia jambolana*. Авторы работы [10] полагают, что противовирусная активность может быть обусловлена полифенольными соединениями и флавоноидами. *Acacia arabica* содержит алкалоиды, антрахиноны, флавоноиды, сапонины, дубильные вещества, редуцирующие сахара и белки. В *Ocimum sanctum* обнаружены сапонины, флавоноиды, тритерпеноиды, танины и эфирные масла. В *Perscia vulgaris* содержатся глюкозиды, нарингенин, хинная кислота, ликопен, дубильные вещества и гликозиды [10]. *Sarracenia purpurea* содержит в своем составе фенольные соединения, флавоноиды, иридоиды [23].

В связи с вышеуказанным, а также с тем, что самую высокую активность в отношении ортопоксвирусов проявили экспериментальные образцы, содержащие в своем составе повышенное содержание флавоноидов, сделано предположение о том, что именно эта группа биологически активных веществ отвечает за противовирусный эффект экстрактов *Alchemilla vulgaris*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован химический состав сухих этанольных, этилацетатных и водных экстрактов из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. Выявлено, что флавоноиды в этанольных и этилацетатных экстрактах представлены такими группами, как катехины, лейкоантоцианы, флавонолы.

Показано, что очищенные этилацетатные и этанольные экстракты *Alchemilla vulgaris* способны проявлять существенную противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов (вирусов осповакцины и оспы мышей) *in vitro*, что делает их перспективными для дальнейшего исследования в качестве потенциальных лекарственных препаратов для лечения вирусных инфекций.

Таким образом, повышенная противовирусная активность очищенных этилацетатных и этанольных экстрактов в сравнении с неочищенными водными и

этанольными экстрактами, вероятно, обусловлена высоким содержанием в них флавоноидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и государственного задания ЦСБС СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борисевич С. В., Маренникова С. С., Махлай А. А. Терентьев А. И., Логинова С. Я., Перекрест В. В., Краснянский В. П., Бондарев В. П., Рыбак С. И. Оспа обезьян: особенности распространения после отмены обязательного оспопрививания. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; 2: 69–73.
2. Parker S., Chen N. G., Foster S. et al. Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox – an animal model of smallpox. *Antiviral Research*. 2012; 94(1): 44–53.
3. Yang G., Pevear D. C., Davies M. H. et al. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal orthopoxvirus Challenge. *Journal of Virology*. 2005; 79(20): 13139–13149.
4. Grosenbach D. W., Honeychurch K., Rose E. A., Chinsangaram, J., Frimm A., Maiti B., Lovejoy C., Meara I., Long P., Hruby D. E. Oral tecovirimat for the treatment of smallpox. *New England Journal of Medicine*. 2018; 379: 44–53.
5. Parker S., Touchette E., Oberle C., Almond M., Robertson A., Trost L. C., Lambert B., Painter G., Buller R. M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether–lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Res.*, 2008; 77(1): 39–49.
6. Rice A. D., Adams M. M., Wallace, G. et al. Efficacy of CMX001 as a post exposure antiviral in New Zealand white rabbits infected with rabbitpox virus, a model for orthopoxvirus infections of humans. *Viruses*. 2011; 3: 47–62.
7. Mazurkov O. Yu., Kabanov A. S., Shishkina L. N., Sergeev A. A., Skarnovich M. O., Bormotov N. I., Skarnovich M. A., Ovchinnikova A. S., Titova K. A., Galahova D. O., Bulychev L. Ye., Sergeev A. A., Taranov O. S., Selivanov B. A., Tikhonov A. Ya., Zavjalov E. L., Agafonov A. P., Sergeev A. N. The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14. *Journal of General Virology*. 2016; 97: 1229–1239. Doi:10.1099/jgv.0.000422.
8. Damon I., Karem K., Olson V. Use of live variola virus to evaluate antiviral agents // WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, Switzerland, 31 Oct. – 1 Nov. 2011: 23–24.
9. Arndt W., Mitnik C., Denzler K.L., White S., Waters R. Jacobs B. L., Rochon Y., Olson V. A., Damon I. K., Langland J. O. *In vitro* Characterization of a Nineteenth-Century Therapy for Smallpox // PLoS ONE. 2012; 7(3): e32610. Doi:10.1371/journal.pone.0032610.
10. Bhanuprakash V., Hosamani M., Balamurugan V., Gandhale P., Naresh R., Swarup D., Singh R. K. *In vitro* antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46: 120–127.
11. Dimins F., Mikelson V., Kaneps M. Antioxidant characteristics of Latvian herbal tea types. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact and Applied Sciences*. 2013; 67(4/5): 433–436. DOI:10.2478/prolas-2013-0067.
12. Jayanegara A., Marquardt S., Kreuzer M., Leiber F. Nutrient and energy content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methanogenic potential of alpine forage plant species during early summer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(10): 1863–1870. DOI:10.1002/jsfa.4398.
13. Shrivastava R., John G. Treatment of aphthous stomatitis with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine. *Clinical Drug Investigation*. 2006; 26(10): 567–573. DOI:10.2165/00044011-200626100-00003.

14. Вайс Р. Ф., Финтельманн Ф. Фитотерапия. Руководство. Пер. с нем. Ю. Коршикова. М.: Медицина. 2004: 552.
15. Мазуркова Н. А., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Ибрагимова Ж. Б., Лобанова И. Е., Филиппова Е. И., Мазурков О. Ю., Макаревич Е. В., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Изучение противогерпетической активности экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 1(14): 118–127.
16. Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Лобанова И. Е., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А. Противовирусные свойства препарата на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в отношении вируса гриппа. *Фундаментальные исследования*. 2015; 2: 5139–5144.
17. Проценко М. А., Костина Н. Е., Теплякова Т. В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer. *Биотехнология*. 2018; 34(1): 45–51.
18. Патент РФ № 2128516. Способ получения Р-витаминного средства / Т. А. Кукушкина, Т. А. Жанаева, А. А. Зыков, Л. А. Обухова, В. Г. Селятская. 1999.
19. Беликов В. В., Шрайбер М. С. Методы анализа флавоноидных соединений. *Фармация*. 1970; 1: 66–72.
20. Кукушкина Т. А., Зыков А. А., Обухова Л. А. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств. Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. *Фитофарм*. 2003: 64–69.
21. Федосеева Л. М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае. *Химия растительного сырья*. 2005; (2): 45–50.
22. Закс Л. Статистическое оценивание. *Статистика*. 1976: 598.
23. Muhammad A., Guerrero-Analco J. A., Martineau L. C., Musallam L., Madiraju P., Nachar A., Saleem A., Haddad P. S., Arnason J. T. Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J. Nat. Prod.* 2012; 75(7): 1284–1288. Doi:10.1021/np3001317.
8. Damon I., Karem K., Olson V. Use of live variola virus to evaluate antiviral agents // WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, Switzerland, 31 Oct. – 1 Nov. 2011: 23–24.
9. Arndt W., Mitnik C., Denzler K.L., White S., Waters R. Jacobs B. L., Rochon Y., Olson V. A., Damon I. K., Langland J. O. *In vitro* Characterization of a Nineteenth-Century Therapy for Smallpox // PLoS ONE. 2012; 7(3): e32610. Doi:10.1371/journal.pone.0032610.
10. Bhanuprakash V., Hosamani M., Balamurugan V., Gandhale P., Naresh R., Swarup D., Singh R. K. *In vitro* antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46: 120–127.
11. Dimins F., Mikelson V., Kaneps M. Antioxidant characteristics of Latvian herbal tea types. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact and Applied Sciences*. 2013; 67(4/5): 433–436. DOI:10.2478/prolas-2013-0067.
12. Jayanegara A., Marquardt S., Kreuzer M., Leiber F. Nutrient and energy content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methanogenic potential of alpine forage plant species during early summer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(10): 1863–1870. DOI:10.1002/jsfa.4398.
13. Shrivastava R., John G. Treatment of aphthous stomatitis with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine. *Clinical Drug Investigation*. 2006; 26(10): 567–573. DOI:10.2165/00044011-200626100-00003.
14. Vajs R. F., Fintelmann F. Herbal medicine. Leadership. Translation from German Yu. Korshikova. M.: *Medicine*. 2004: 552 (in Russ.).
15. Mazurkova N. A., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Ibragimova Zh. B., Lobanova I. Ye., Filippova Ye. I., Mazurkov O. Yu., Makarevich Ye. V., Shishkina L. N., Agafonov A. P. Study of antiherpetic activity of lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) extracts. *Drug development & registration*. 2016; 1(14): 118–127 (in Russ.).
16. Filippova E. I., Kukushkina T. A., Lobanova I. E., Vysochina G. I., Mazurkova N. A. Antiviral properties based drug total flavonoids lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) against influenza virus. *Fundamental research*. 2015; 2: 5139–5144 (in Russ.).
17. Protzenko M. A., Kostina N. E., Teplyakova T. V. Selection of Nutrient Media for Submerged Culturing of Wood-Destroying Mushroom of *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer. *Biotechnology*. 2018; 34(1): 45–51 (in Russ.).
18. RF patent No. 2128516. The method of obtaining P-vitamin funds / T. A. Kukushkina, T. A. Zhanaev, A. A. Zыков, L. A. Obukhova, V. G. Selyatitskaya. 1999 (in Russ.).
19. Belikov V. V., Shrajber M. S. Methods of analysis of flavonoid compounds. *Farmaciya*. 1970: 1: 66–72 (in Russ.).
20. Kukushkina T. A., Zыков A. A., Obukhova L. A. Common cuff (*Alchemilla vulgaris* L.) as a source of medicines. Actual problems of creating new drugs of natural origin. *Fitofarm*. 2003: 64–69. (in Russ.).
21. Fedoseeva L. M. The study of tannins of underground and aboveground vegetative organs of the *Bergenia Crassifolia* (L.) Fitch., growing in Altai. *Chemistry of plant raw material*. 2005; (2): 45–50 (in Russ.).
22. Zaks L. Statistical evaluation. *Statistika*. 1976: 598 (in Russ.).
23. Muhammad A., Guerrero-Analco J. A., Martineau L. C., Musallam L., Madiraju P., Nachar A., Saleem A., Haddad P. S., Arnason J. T. Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J. Nat. Prod.* 2012; 75(7): 1284–1288. Doi:10.1021/np3001317.
1. Borisevich S. V., Marennikova S. S., Makhlai A. A., Terentiev A. I., Loginova S. Ya., Perekrest V. V., Krasnyansky V. P., Bondarev V. P., Rybak S. I. Monkeypox: features of spread after cancellation of mandatory pox immunization. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2012; 2: 69–73 (in Russ.).
2. Parker S., Chen N. G., Foster S. et al. Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox – an animal model of smallpox. *Antiviral Research*. 2012; 94(1): 44–53.
3. Yang G., Pevear D. C., Davies M. H. et al. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal orthopoxvirus Challenge. *Journal of Virology*. 2005; 79(20): 13139–13149.
4. Grosenbach D. W., Honeychurch K., Rose E. A., Chinsangaram, J., Frimm A., Maiti B., Lovejoy C., Meara I., Long P., Hruby D. E. Oral tecovirimat for the treatment of smallpox. *New England Journal of Medicine*. 2018; 379: 44–53.
5. Parker S., Touchette E., Oberle C., Almond M., Robertson A., Trost L. C., Lampert B., Painter G., Buller R. M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether–lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Res.* 2008; 77(1): 39–49.
6. Rice A. D., Adams M. M., Wallace, G. et al. Efficacy of CMX001 as a post exposure antiviral in New Zealand white rabbits infected with rabbitpox virus, a model for orthopoxvirus infections of humans. *Viruses*. 2011; 3: 47–62.
7. Mazurkov O. Yu., Kabanov A. S., Shishkina L. N., Sergeev A. A., Skarnovich M. O., Bormotov N. I., Skarnovich M. A., Ovchinnikova A. S., Titova K. A., Galahova D. O., Bulychev L. Ye., Sergeev A. A., Taranov O. S., Selivanov B. A., Tikhonov A. Ya., Zavjalov E. L., Agafonov A. P., Sergeev A. N. The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14. *Journal of General Virology*. 2016; 97: 1229–1239. Doi:10.1099/jgv.0.000422.

## REFERENCES

## Разработка состава и технологии капсул с ресвератролом

М. С. Сокурено<sup>1\*</sup>, С. П. Кречетов<sup>2</sup>, С. А. Олифер<sup>3</sup>, И. И. Краснюк<sup>3</sup>, Н. Л. Соловьёва<sup>3</sup>,  
М. А. Макаренко<sup>1</sup>, Н. Б. Демина<sup>3</sup>

1 – ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

2 – ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ), 141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9.

3 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

\*Контактное лицо: Сокурено Мария Сергеевна. E-mail: sokmary@mail.ru

Статья получена: 16.09.2019. Статья принята к печати: 24.10.2019

### Резюме

**Введение.** Ресвератрол, как вещество с широким спектром биологического действия, представляет научный интерес, но его низкая биодоступность при пероральном способе введения приводит к ограничению использования. Поэтому перед нами была поставлена задача увеличения его растворимости при помощи различных групп вспомогательных веществ и создания твёрдой лекарственной формы. В результате проведённых исследований нами была выбрана группа твинов и разработана технология изготовления капсул с ресвератролом, содержащих 40 мг действующего вещества.

**Цель.** Создание твёрдой лекарственной формы – капсулы с ресвератролом в составе с твином 80 как солюбилизатора и другими вспомогательными веществами.

**Материалы и методы.** Разработана композиция с ресвератролом, твином 80, глицерином, лимонной и аскорбиновой кислотами в качестве стабилизаторов, а так же был использован метанол в качестве общего растворителя, который после полного растворения всех компонентов и получения однородной массы отгонялся. После добавления к полученной композиции оливкового масла, в качестве наполнителя, смеси нипазола и нипагина (0,03 % от массы содержимого), полученный состав перемешивался вручную и разливался по капсулам, которые впоследствии запаивались желатином для герметичности. Исследованы показатели качества полученных капсул согласно требованиям ГФ XIV РФ (описание, распадаемость, растворение, однородность дозирования, остаточные органические растворители), а также показатели окисления.

**Результаты и обсуждение.** В ходе проведенных испытаний было установлено, что полученные образцы капсул с ресвератролом, содержащие 40 мг/капс. действующего вещества и твин 80 в качестве солюбилизатора, обладают хорошей распадаемостью, а исследуемая субстанция хорошо растворяется в солянокислой среде, что свидетельствует о его высокой биодоступности.

**Заключение.** Для производства капсул с ресвератролом (40 мг/капс.), содержащей твин 80, глицерин, лимонную и аскорбиновую кислоты, были подобраны вспомогательные вещества, согласно проведённым исследованиям, подтверждающие улучшение биодоступности ресвератрола. Проведена оценка качества ЛФ в соответствии с ГФ XIV изд.: показано, что использование твина 80 в качестве солюбилизатора повышает высвобождение ресвератрола в среде желудочного сока.

**Ключевые слова:** биодоступность, полифенольные соединения, антиоксиданты, ресвератрол, твин 80.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Авторы Сокурено М. С., Кречетов С. П., Соловьёва Н. Л. занимались разработкой эксперимента. Сокурено М. С., Олифер С. А., Макаренко М. А. разрабатывали, исследовали полученные субстанции и лекарственную форму. Сокурено М. С., Кречетов С. П., Макаренко М. А. участвовали в обработке полученных данных. Сокурено М. С., Краснюк И. И., Демина Н. Б. и Соловьёва Н. Л. участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Для цитирования:** Сокурено М. С., Кречетов С. П., Олифер С. А., Краснюк И. И., Соловьёва Н. Л., Макаренко М. А., Демина Н. Б. Разработка состава и технологии капсул с ресвератролом. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 16–19.

## Development of Composition and Technology of Resveratrol Capsules

Mariya S. Sokurenko<sup>1\*</sup>, Sergei P. Krechetov<sup>3</sup>, Sofia A. Olifer<sup>3</sup>, Ivan I. Krasnyuk<sup>3</sup>, Natalia L. Solovyova<sup>3</sup>,  
Mariya A. Makarenko<sup>1</sup>, Natalia B. Demina<sup>3</sup>

1 – Scientific Research Institute of Nutrition, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

2 – Moscow Institute of Physics and Technology, MIPT, 9, Institutsky Lane, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701, Russia

3 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Mariya S. Sokurenko. E-mail: sokmary@mail.ru

Received: 16.09.2019. Accepted: 24.10.2019

### Abstract

**Introduction.** Resveratrol is of scientific interest as a substance with a wide range of biological effects. However, its low bioavailability leads to limited use when administered orally. Therefore, the objective was to increase its solubility using various groups of excipients and create a solid dosage form. As a result of research, a group of twins was selected and the technology of manufacturing capsules containing 40 mg of resveratrol as an active substance was developed.

**Aim.** The development of a solid dosage form – capsules containing resveratrol, tween 80 as a solubilizer and other excipients.

**Materials and methods.** A composition with resveratrol, tween 80, glycerin, citric and ascorbic acids as stabilizers was developed. Methanol was used as a common solvent and was distilled off after complete dissolution of all components and obtaining a homogeneous mass. After adding olive oil (as a filler) to the resulting composition and a mixture of nipazole and nipagin (0.03 % by weight of the contents), the composition was manually mixed and poured into subsequently gelatin coated capsules for tightness. The quality indicators of the obtained capsules were studied in accordance

© Сокурено М. С., Кречетов С. П., Олифер С. А., Краснюк И. И., Соловьёва Н. Л., Макаренко М. А., Демина Н. Б., 2019

© Sokurenko M. S., Krechetov S. P., Olifer S. A., Krasnyuk I. I., Solovyova N. L., Makarenko M. A., Demina N. B., 2019

with the requirements of the State pharmacopoeia XIV of Russian Federation (description, disintegration, dissolution, uniformity of dosage, residual organic solvents), as well as oxidation indicators.

**Results and discussion.** During the research it was found that the obtained samples of capsules containing resveratrol 40 mg/caps. as an active substance, and tween 80 as a solubilizer, had a good disintegration. The substance is well soluble in hydrochloric acid condition, which indicates its high bioavailability.

**Conclusion.** To produce capsules with resveratrol (40 mg/caps.) containing tween 80, glycerin, citric and ascorbic acids, excipients were selected according to studies that confirm the improvement of resveratrol bioavailability. The quality of the dosage form was assessed in accordance with the State Pharmacopoeia XIVth edition: it was shown that the use of Tween 80 as a solubilizer increases the release of resveratrol in the environment of gastric juice.

**Keywords:** bioavailability, polyphenolic compounds, antioxidants, resveratrol, tween 80.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Authors of articles Maria S. Sokurenko, Sergei P. Krechetov, Natalia L. Solovyova were engaged in the development of the experiment. Maria S. Sokurenko, Sofia A. Olifer, Maria A. Makarenko were engaged in the development and research of the obtained substances and dosage form. Authors Maria S. Sokurenko, Sergei P. Krechetov, Maria A. Makarenko participated in the data processing. Maria S. Sokurenko, Ivan I. Krasnyuk, Natalia B. Demina and Natalia L. Solovyova participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

**For citation:** Sokurenko M. S., Krechetov S. P., Olifer S. A., Krasnyuk I. I., Solovyova N. L., Makarenko M. A., Demina N. B. Development of composition and technology of resveratrol capsules. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 16–19.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема биодоступности нерастворимых и плохо растворимых лекарственных субстанций, в частности, широко распространённой группы биологически активных веществ – полифенолов – актуальна и на данный момент имеет несколько путей решения.

- ✓ Физические (различные виды сушки и инкапсуляции).
- ✓ Химические (получение дисперсий).
- ✓ Физико-химические (солюбилизация, введение веществ липидной природы и сорастворителей).
- ✓ Методы, основанные на ионных и гидрофобных взаимодействиях.
- ✓ Другие технологически приёмы. [1, 2].

Ранее нами был предложен способ повышения биодоступности ресвератрола в твёрдой лекарственной форме, основанный на использовании солюбилизатора метил-β-циклодекстрина с последующим растворением в метаноле, используемом в качестве общего растворителя [3].

Другой изученной нами группой солюбилизаторов были твины (20, 40, 80). Согласно предварительно проведённым испытаниям лучший результат продемонстрировала композиция с твином 80.

**Целью данной работы** является создание твёрдых капсул с жидким содержимым, куда входит ресвератролом, обладающим улучшенными физико-химическими и технологическими характеристиками.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На начальном этапе при разработке жидкой композиции с ресвератролом, обладающей хорошей растворимостью в воде, были использованы следующие компоненты: транс-ресвератрол (не менее

99 % основного вещества resVida, DSM, Швейцария); полисорбат Tween 80 (Т80), лимонная и аскорбиновая кислоты, глицерин от Sigma Aldrich (США); метанол, используемый в качестве растворителя («Кемикал Лайн», РФ). Полученная композиция содержала 10 % ресвератрола, 2,5 % глицерина, 2,5 % аскорбиновой кислоты и 2,5 % лимонной кислоты, остальную массу составил твин 80. Метанол отгонялся на ротационном испарителе с вакуумным насосом после полного растворения всех сухих компонентов композиции.

На следующем этапе после изучения фармацевтического рынка вспомогательных веществ для создания содержимого твёрдых капсул методом прямого розлива, нами были выбраны следующие вспомогательные субстанции: оливковое масло рафинированное (Греция), нипазол (Россия), нипагин (Россия).

Технологические свойства исследовали согласно требованиям, предъявляемым к таблеткам, которые указаны в ОФС.1.4.1.0005.15 «Капсулы» ГФ XIV РФ:

- описание (оценку внешнего вида капсул осуществляли визуально);
- распадаемость капсул (определяли согласно ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул»);
- тест «Растворение» (проводили согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм»);
- однородность дозирования (определяли согласно ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования». Применяли способ № 1. Исследования проводили методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием [4]).

Капсулы массой 1000 мг изготавливали вручную.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительные исследования продемонстрировали хорошие физико-технологические показатели композиции ресвератрола с твином 80, глицерином, аскорбиновой и лимонной кислотами (состав указан в таблице 1). Содержание ресвератрола, в исследуемой лекарственной форме, составило 40 мг/капс. (диапазон терапевтической дозы согласно научным публикациям составляет 20–80 мг [5, 6]).

Был разработан состав, представленный в таблице 1.

**Таблица 1.** Состав содержимого капсулы

**Table 1.** The composition of the contents of the capsule

| Наименование вещества                    | Ингредиенты на 1 капсулу, мг (m = 1000)* |
|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Композиция, содержащая 10 % ресвератрола | 400                                      |
| Оливковое масло                          | 400                                      |
| Нипазол                                  | 0,03 % от массы содержимого капсулы      |
| Нипагин                                  |                                          |
| Желатин (для запайки капсулы)            | 90–100                                   |

**Примечание:** \*Допустимое отклонение по массе составляет 5 %.

**Note:** \*Tolerance by weight is 5 %.

Были использованы капсулы Licaps® Capsugel® № 1, которые заполнялись содержимым шприцевым способом. На стык частей капсулы наносился раствор желатина для герметизации шва.

Технологические характеристики модельных капсул с ресвератролом представлены в таблице 2.

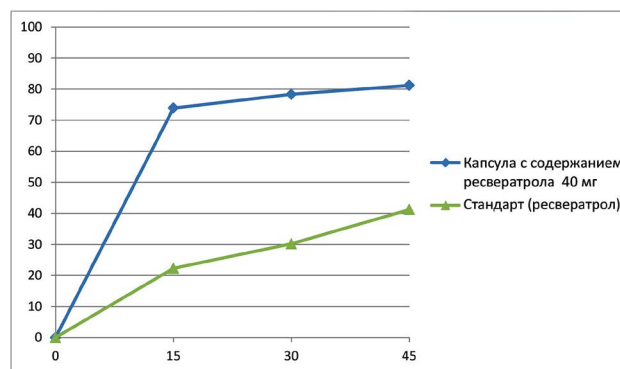
Согласно проведенным исследованиям, полученные капсулы соответствуют требованиям, указанным в соответствующих ОФС и других нормативных документов.

Тест «Растворение». Проводили на аппарате типа «Лопастная мешалка».

В качестве среды растворения применялся раствор 0,1 М соляной кислоты без добавления фермента. Отбор проб производился в течение 1 часа через каждые 15 минут после начала испытания.

Брали среднее значение по результатам исследования двух капсул, представленных на рисунке 1, и ресвератрола, взятого в качестве стандарта.

Определение содержания ресвератрола в пробе проводили методом ВЭЖХ с диодно-матричным detec-



**Рисунок 1.** Содержание ресвератрола, высвободившегося в среду растворения за 45 минут, %

торованием (колонка Poroshell 120 EC-C18, 4,6 × 50 мм, 2,7 мкм, Agilent Technologies, США). Содержание ресвератрола, высвободившегося в среду растворения за 45 минут составило 81,2 %.

**Таблица 2.** Технологические характеристики модельных составов капсул и однородность дозирования ресвератрола

**Table 2.** Technological characteristics capsule formulations and uniformity dosing of resveratrol

| Показатели                                                           | Характеристика                                       |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Внешние признаки                                                     | Прозрачные капсулы с жидким содержимым жёлтого цвета |
| Распадаемость, мин                                                   | 12 мин 50 с                                          |
| Однородность массы, мг                                               | 1000 (±5 %)                                          |
| Однородность дозирования, %*                                         | 99,8 %                                               |
| Остаточные органические растворители**                               | Менее 1 мг/капс.                                     |
| Показатели качества (перекисное число – ПЧ; кислотное число – КЧ)*** | ПЧ < 10,0 ммоль акт.О/1000 г<br>КЧ < 4,0 мг КОН/г    |

**Примечание:** \*% от введенного в состав ресвератрола, погрешность метода определения составляет 10 %.

\*\*Согласно ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители».

\*\*\*Согласно ГОСТ Р 50457-92 «Жиры и масла животные и растительные. Определение кислотного числа и кислотности» и ГОСТ Р 51487-99 «Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа».

В результате проведенных испытаний было установлено, что полученные образцы капсул, содержащие 10 % ресвератрола (40 мг/капс.), и твин 80 в качестве солюбилизатора, обладают хорошей распадаемостью, а исследуемая субстанция хорошо растворяется в солянокислой среде, что может свидетельствовать о его высокой биодоступности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для производства капсул с ресвератролом (40 мг/капс.), содержащей твин 80, глицерин, лимонную и аскорбиновую кислоты, были подобраны вспомогательные вещества, согласно проведённым исследованиям, подтверждающие улучшение биодоступности ресвератрола. Проведена оценка качества ЛФ в соответствии с ГФ XIV изд. Показано, что использование твина 80 в качестве солюбилизатора повышает высвобождение ресвератрола в среде желудочного сока.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Соловьёва Н. Л., Сокурено М. С. Технологии повышения стабильности полифенольных соединений в лекарственных препаратах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 4(17): 82–91.
2. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 2(19): 56–60.
3. Сокурено М. С., Кречетов С. П., Олифер С. А., Краснюк И. И., Кугач В. В., Соловьёва Н. Л. Исследование технологических свойств таблеточных масс и таблеток ресвератрола. *Вестник фармации*. 2019; 2(84): 69–73.
4. В. А. Тутельяна и др. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи. *Династия*. 2010: 180 с.
5. Carter L. G., D'Orazio J. A., Pearson K. J. Resveratrol and cancer: focus on *in vivo* evidence. *EndocrRelat Cancer*. 2014; 21(3): 209–225. DOI: 10.1530/erc-13-0171.
6. Wenzel E., Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular nutrition & food research*. 2005; 49(5): 472–481. DOI: 10.1002/mnfr.200500010.

## REFERENCES

1. Solovieva N. L., Sokurenko M. S. Technologies to improve the stability of polyphenolic compounds in drug discovery. *Drug development & registration*. 2016; 4(17): 82–91 (In Russ.).
2. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Drug development & registration*. 2017; 2(19): 56–60 (In Russ.).
3. Sokurenko M. S., Krechetov S. P., Olfier S. A., Krasnjuk I. I., Kugach V. V., Solovieva N. L. Research of technological properties of tablet masses and resveratrol tablets. *Pharmacy Bulletin*. 2019; 2(84): 69–73 (In Russ.).
4. Tutel'jana V. A. et al. Methods of analysis of minor biologically active substances of food. *Dynasty*. 2010: 180 (In Russ.).
5. Carter L. G., D'Orazio J. A., Pearson K. J. Resveratrol and cancer: focus on *in vivo* evidence. *EndocrRelat Cancer*. 2014; 21(3): 209–225. DOI: 10.1530/erc-13-0171.
6. Wenzel E., Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular nutrition & food research*. 2005; 49(5): 472–481. DOI: 10.1002/mnfr.200500010.

## Анализ возможности применения принципа QbD к процессу разработки лекарственных средств на отечественных фармацевтических предприятиях

С. А. Рожнова<sup>1</sup>, А. В. Цыпкина<sup>1\*</sup>

1 – ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

\*Контактное лицо: Цыпкина Анастасия В. E-mail: [nastenka.tsypkina@mail.ru](mailto:nastenka.tsypkina@mail.ru)

Статья получена: 17.09.2019. Статья принята к печати: 01.11.2019

### Резюме

**Введение.** При разработке и внедрении в производство лекарственных средств (ЛС) целью разработчиков является соблюдение принципа «качества, запланированного при разработке» (QbD). Международным советом по гармонизации (ICH) был создан ряд стандартов GxP, которые стали нормативной базой для разработки документации, регламентирующей требования к разработке и производству ЛС для стран, ориентированных на выведение произведенной продукции на мировой фармацевтический рынок. Анализ регулирования фармацевтических этапов разработки новых ЛС на территории Евразийского экономического союза не рассматривался, но для формирования организационного подхода к управлению процессами на этом этапе жизненного цикла ЛС необходимо разработать системный подход и методическое сопровождение отдельных этапов ФР.

**Цель.** Проанализировать возможность применения принципа QbD к процессу разработки ЛС на отечественных фармацевтических предприятиях.

**Материалы и методы.** Контент-анализ данных научных публикаций, системный и сравнительный анализ, социологические методы исследования в области ФР и внедрения новых ЛС.

**Результаты и обсуждения.** Проанализированы и описаны регуляторные требования со стороны государств к организации и проведению процедур ФР. Определен ряд системных и отраслевых проблем характерных для отечественных фармацевтических производителей при организации процессов разработки и внедрения новых ЛС. Установлено, что одной из основных проблем для российских предприятий являлась организация процесса в целом и отдельных его процедур. Для решения проблемы организации процедур разработки и внедрения новых ЛС нами было сформировано методическое сопровождение, разработанное на основе системного подхода и международных требований со стороны системы качества.

**Заключение.** Основной из проблем, указанных производителями, является недостаточное методическое сопровождение организации процессов ФР и внедрения новых ЛС в части исследований, проходящих до стадии доклинической и клинической разработки. Решения принятые ЕЭС, не затрагивают таких аспектов регулирования ФР как организация процессов, управление ими и методическое сопровождение, направленное на реализацию принципа QbD. Для решения указанной проблемы нами были разработаны методические рекомендации по реализации процессов ФР и внедрения новых ЛС, которые позволили применять унифицированные и формализованные подходы к их организации.

**Ключевые слова:** регуляторные системы обращения лекарственных средств, фармацевтическая разработка, внедрение в производство новых лекарственных средств.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Рожнова С. А. определила направление исследования. Рожнова С. А. и Цыпкина А. В. разработали анкеты, позволяющие раскрыть цель и задачи исследования, установили критерии выбора предприятий для проведения анкетирования и интервьюирования респондентов. Цыпкина А. В. проводила интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ возможности применения принципа QbD к процессу разработки лекарственных средств на отечественных фармацевтических предприятиях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 20–26.

## Comparative Analysis of the QbD Approach in the Pharmaceutical Industry

Svetlana A. Rozhnova<sup>1</sup>, Anastasia V. Tsypkina<sup>1\*</sup>

1 – Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovitjanova str., Moscow, 117997, Russia

\*Corresponding author: Anastasia V. Tsypkina. E-mail: [nastenka.tsypkina@mail.ru](mailto:nastenka.tsypkina@mail.ru)

Received: 17.09.2019. Accepted: 01.11.2019

### Abstract

**Introduction.** In the development and introduction of medicines into production, the aim of pharmaceutical manufacturers is to comply with the principle of «Quality-by-Design» (QbD). The International Council for Harmonisation (ICH) has created a number of GxP standards, which have become the regulatory framework for the development of documentation regulating the requirements for the development and production of drug products for countries focused on bringing their products to the world pharmaceutical market. The analysis of the system of regulation of pharmaceutical stages of development of new drugs in the territory of the Eurasian Economic Union was not considered, but for the formation of a systematic approach to the management of the process of pharmaceutical development it is necessary to describe them.

**Aim.** To analyze the possibility of applying the QbD principle to the process of drug development at domestic pharmaceutical enterprises.

**Materials and methods.** Content analysis of scientific publications, system and comparative analysis, sociological methods of research in the field of pharmaceutical development.

© Рожнова С. А., Цыпкина А. В., 2019

© Rozhnova S. A., Tsypkina A. V., 2019

**Results and discussions.** Regulatory state requirements to the organization and conduct of drug development procedures are analyzed and described. A number of systemic and sectoral problems typical for domestic pharmaceutical manufacturers in the organization of the development and implementation of new drug products. It is established that one of the main problems for Russian enterprises was the organization of the process as a whole and its individual procedures. To solve the problem of organization of procedures for the development and implementation of new medicines, we formed a methodological support, developed on the basis of a systematic approach and international requirements from the quality system.

**Conclusion.** The main problem identified by the manufacturers is the lack of methodological support for the organization of the processes of pharmaceutical development and the introduction of new drugs in the part of research going to the stage of preclinical and clinical development. The decisions adopted by the Eurasian Economic Union do not affect such aspects of pharmaceutical development regulation as the organization of processes, their management and methodological support aimed at the implementation of the QbD principle. To solve this problem, we have developed guidelines for the implementation of the processes of pharmaceutical development and the introduction of new drug products, which allowed us to apply unified and formalized approaches to their organization.

**Keywords:** regulatory systems of drug circulation, pharmaceutical development, introduction of new drugs into production.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Svetlana A. Rozhnova determined the direction of the study. Svetlana A. Rozhnova, Anastasia V. Tsyapkina developed questionnaires to reveal the purpose and objectives of the study, established criteria for selecting enterprises for conducting questionnaires and interviewing respondents. Anastasia V. Tsyapkina conducted the interpretation of the results. All the authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

**For citation:** Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. Comparative analysis of the QbD approach in the pharmaceutical industry. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 20–26.

## ВВЕДЕНИЕ

При разработке и внедрении в производство лекарственных средств (ЛС) целью разработчиков является соблюдение принципа «качества, запланированного при разработке» (Quality-by-Design) (QbD). Данный принцип основанный на кастомизации в отношении конечного потребителя, формирует связь между потребностями пациента, возможностями разработчика и условиями производителя, оптимальными для создания эффективного, безопасного ЛС с запланированными и достаточными показателями качества [1, 2].

Регуляторами системы обращения ЛС многих развитых стран [страны Европейского союза (ЕС), Соединенных Штатов Америки (США), Японии] в рамках Международного совета по гармонизации (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) (ICH) приняты документы, регламентирующие подходы к фармацевтической разработке (ФР), сформированные с учетом особенностей организации процессов и международных стандартов надлежащих практик (good x practice – GxP): доклинических исследований (good laboratory practice – GLP), клинических исследований (good clinical practice – GCP), производства лекарственных препаратов (ЛП) (good manufacturing practice – GMP), хранения ЛП (good storage practice – GSP) [2].

Данные стандарты стали нормативной базой для разработки документации, регламентирующей требования к разработке и производству ЛС для стран, ориентированных на выведение произведенной продукции на мировой фармацевтический рынок.

Современная концепция обеспечения качества при ФР ЛС, основанная на подходе QbD, определяется руководствами ICH: ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» [3], ICH Q9 «Управление рисками для качества» [4] и ICH Q10 «Фармацевтическая система ка-

чества» [5], ICH Q11 «Разработка и производство лекарственных субстанций» [6].

В ЕС действует иерархическая законодательная система в области регулирования обращения ЛС, включая ФР. В данном случае верховенством обладает Договор о функционировании ЕС, в соответствии с которым принимаются директивы, регламенты, решения и другие документы ЕС, а затем – законодательные акты национального уровня стран-членов ЕС. Вопросы, которые не рассматриваются законодательством ЕС, регулируются национальным законодательством государства-члена ЕС (таблица 1).

В США основным органом регулирующим сферу обращения ЛС, является управление по контролю качества пищевых продуктов и ЛС (Food and Drug Administration – FDA). Полномочия и функции Агентства сводятся к защите прав потребителей от опасных и недоброкачественных продуктов, стимулированию разработки новых ЛП, экспертизе ЛС перед его выпуском в обращение [15].

Евразийский экономический союз (ЕЭС) созданный в 2010 году в числе первоочередных нормативно-правовых актов, ввел в действие документы, регламентирующие порядок регулирования в сфере обращения ЛС [16, 17]. Данные документы основанные на международных принципах GxP, направлены на такие сферы как: регистрация ЛС, доклиническая и клиническая разработка, производство ЛС, контроль качества ЛС и др. [18–25].

В области ФР нормативные требования ЕЭС затрагивают порядок проведения доклинической и клинической разработки (насколько корректен термин? – в Решениях ЕАЭС используется данный термин «Руководство по требованиям к доклинической и клинической разработке комбинированных лекарственных препаратов» – [http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/LS1/Pages/WP\\_LA\\_projects.aspx](http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/LS1/Pages/WP_LA_projects.aspx)); формирование регистрационного досье на ЛП и правила регистрации ЛП в странах ЕЭС.

**Таблица 1. Основная нормативная документация системы обеспечения качества ЛС в ЕС**

**Table 1. The main regulatory documentation EU quality assurance systems in the EU**

| Директивы  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | Директива Европейского парламента и Совета Европы 2001/83/ЕС от 06.11.2001 г. регламентирует создание, производство, регистрацию, контроль качества и реализацию лекарственных средств (ЛС) [7]                                                                                                                         |
| 2          | Директива Европейской комиссии 2003/94/ЕС определяет принципы и подробные рекомендации надлежащей производственной практики в сфере ЛС [8]                                                                                                                                                                              |
| 3          | Директива Европейской комиссии 2005/28/ЕС устанавливает принципы и подробные рекомендации в сфере исследуемых ЛС для применения у человека, а также требований к получению разрешения на их импортирование [9]                                                                                                          |
| Регламенты |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1          | Регламент Европейского парламента и Совета № 536/2014 регулирует проведение клинических исследований ЛС для применения у человека [10]                                                                                                                                                                                  |
| 2          | Регламент Европейского парламента и Совета № 726/2004 определяет процедуры Европейского сообщества для получения разрешения и надзора за обращением ЛС для применения у человека и использования в ветеринарии, а также создает Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency – EMA) [11] |
| 3          | Регламент Европейской комиссии № 540/95 определяет порядок предоставления отчетов о возможных непредвиденных побочных реакциях ЛС [12]                                                                                                                                                                                  |
| 4          | Регламент Европейского парламента и Совета № 596/2009 регулирует допуск и обращение орфанных препаратов [13]                                                                                                                                                                                                            |
| 5          | Регламент Европейского парламента и Совета № 1901/2006 регулирует сферу ЛС для применения в педиатрии [14]                                                                                                                                                                                                              |

Однако остается ряд стратегических вопросов, направленных на обеспечение принципов QbD и требующих решения:

- совместная организация работы фармацевтических компаний в альянсе с разработчиками, которые, как правило, разрабатывают и вводят новые технологии для более продуктивного удовлетворения запросов потребителей;
- отсутствие нормативно-правовых документов, регламентирующих и формализующих порядок, и последовательность выполнения процесса разработки ЛС;
- отсутствие документации методического профиля, формализующего процессы и составляющие их процедуры, направленного на исполнение принципа «качества запланированного при разработке».

Тем не менее, научное сообщество и предприятия фармацевтической промышленности в России активно занимаются разработкой новых ЛС и расширяют ассортимент отечественной продукции.

Так, проведенный нами анализ государственного реестра ЛС (ГРЛС) показал, что с 2015 по 2018 гг. количество российских ЛС, вводимых в обращение на фармацевтический рынок Российской Федерации (РФ) увеличилось в 14 раз (с 86 до 1226 наименований ЛС).

При анализе отчетов научных работ в области разработки ЛС установлено, что российскими авторами описаны различные аспекты данного направления: разработка технологии и методов контроля

качества, трансфер технологий, экономические и маркетинговые исследования, подготовка кадров для научно-практической деятельности в области ФР и производства ЛС и др. [26–32]. При этом системный подход к организации и управлению процессами ФР и внедрения ЛС не составлял предмета исследования для авторов данных отчетов. В связи с этим актуальным является вопрос изучения проблем, возникающих у отечественных фармацевтических производителей при проведении ФР и разработки системного подхода к организации процедур разработки, что явилось целью нашей работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Контент-анализ данных научных публикаций системный и сравнительный анализ, социологические методы исследования области ФР.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исследование выполненное нами, направлено на изучение организации процесса ФР с целью выявления общих и специфически практических проблем достижения принципов QbD, характерных для отечественных фармацевтических производителей. Полученные данные послужили основой для разработки методического сопровождения исследуемых процессов.

Для решения задач исследования нами были выбраны следующие направления: организация процессов ФР и управления ими, анализ трудовых ресурсов предприятия, оценка подготовленности персонала фармацевтических предприятий, анализ локальной документации, регламентирующей и регистрирующей исследуемые нами процессы.

Для выполнения исследований нами был разработан комплект анкет, представляющий собой комплекс вопросов, позволяющих провести сбор информации для составления методических рекомендаций, сопровождающих данные процессы.

Анкетирование и интервьюирование было проведено на российских предприятиях, специализирующихся на производстве различных ЛС: фармацевтических субстанций; ЛП полученных методами химического и биотехнологического синтеза; радиофармацевтических ЛС; биологических ЛП; растительных ЛП.

В анкетировании участвовали специалисты предприятий, непосредственно участвующие в процессе разработки и внедрении ЛС. Интервьюирование было проведено с руководителями отделов: разработки, контроля качества, производственного отдела, а также с лицами, ответственными за расширение ассортимента портфеля фармацевтического предприятия.

Анализ анкет показал, что основными проблемами российских предприятий при ФР и внедрении в производство новых ЛС являются: недостаток внутренних документов, регламентирующих и регистри-

рующих процесс ФР (75 %), кадровый дефицит (62,5 %), низкое финансирование (50 %), функциональная организация процесса в целом и отдельных его процедур (37,5 %); к специфическим относятся – отсутствие на ряде предприятий современного технологического оснащения, дефицит субстанций, вспомогательных веществ и упаковочного материала отечественного производства.

На рисунке 1 представлены результаты исследования критических факторов, оказывающих влияние на процессы, составляющие ФР и внедрение в производство ЛС на отечественных промышленных предприятиях.

Анализ показал, что некоторые из факторов внутренней среды существенно затрудняют разработку новых ЛС на базе отечественных фармацевтических предприятий. К таким факторам можно отнести:

- ✓ отсутствие методической документации, направленной на организацию и систематизацию процессов ФР;

- ✓ недостаточное финансирование проектов за счет собственных средств;
- ✓ недостаток квалифицированного персонала;
- ✓ высокая конкуренция со стороны зарубежных фармацевтических компаний.

Решение одной из основных проблем – организации процесса ФР, возможно при разработке на предприятиях комплекса методического сопровождения отдельных этапов и процедур, основанного на требованиях международных стандартов и российского законодательства, а также учитывающего принципы системного подхода к описанию совокупности элементов исследуемых процессов.

Для решения указанной проблемы нами были разработаны методические рекомендации (МР). Комплект разработанного методического обеспечения включал:

1. МР по ФР нового для предприятия ЛС (аналитический этап) [33, 34].
2. МР по внедрению ЛС в производство фармацевтического предприятия.



**Рисунок 1.** Проблемы разработки и внедрения в производство ЛС, выявленные при анализе внутренней среды фармацевтических предприятий

**Figure 1.** Problems of development and implementation of drugs in the production identified in the analysis of the internal environment of pharmaceutical enterprises

3. МР по использованию методологии IDEF0 [Integrated Definition Function Modeling (Моделирование бизнес процессов управления)] для графического описании процедур ФР [35–37].

МР разработаны с учетом требований международных стандартов и действующего законодательства РФ.

В части терминологии и определения основных терминов в МР были использованы:

- ✓ Федеральный закон РФ от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (статья 4) [38].
- ✓ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (статья 2) [18].
- ✓ Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики» (статьи 2 и 3).
- ✓ ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» (часть 1) [3].
- ✓ ICH Q9 «Управление рисками по качеству» (часть 1) [4].
- ✓ ICH Q10 «Фармацевтическая система качества» (часть 1) [5].
- ✓ Методология функционального моделирования РД IDEF0 (глава 3).

В части требований к разработке форм и классификации документации в МР был использован:

- ✓ Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики» [статья 3 (глава 4)] [39].

В части требований к персоналу был использован:

- ✓ Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики» [статья 3 (глава 2)].

В части требований к построению графических моделей был использован стандарт:

- ✓ Методология функционального моделирования РД IDEF0 (главы 5–10).

Данные МР носят рекомендательный характер и позволяют предприятию на их основе разработать внутреннюю регламентирующую документацию по выполнению процессов и СОП (стандартных операционных процедур) по выполнению процедур ФР.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отечественные регуляторные органы и производители ЛС направляют свою деятельность на гармонизацию с общемировыми стандартами качества. В сферу обращения ЛС прочно вошли надлежащие практики ЕС и США, образовано единое экономическое пространство – ЕАЭС. Однако, остается ряд системных и отраслевых проблем, касающихся организации процессов ФР и внедрения новых ЛС.

Так, основной из проблем, указанных производителями, является недостаточное методическое сопровождение организации процессов ФР и внедрения но-

вых ЛС в части исследований проходящих до стадии доклинической и клинической разработки.

Для решения указанной проблемы нами были разработаны МР для реализации процессов ФР, которые позволят применять унифицированные и формализованные подходы к проведению этапов ФР, и процесса внедрения новых ЛС.

На основании предложенных нами МР на предприятиях могут быть сформированы методические указания, которые являются максимально конкретными и предметными, обязательны к выполнению, а также при организации, проведении процессов разработки и внедрения новых ЛС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Эндрю Д. Дж. Производство лекарственных средств. Химическая технология от R&D до производства. – СПб.: Профессия. 2015: 1280.
2. Watson T. N. J., Nosal R., am Ende D., Bronk K., Mustakis J., O'Connor G., Santa Maria C. L. J. Pharmaceut. Innovation. 2007; 2(3-4): 71.
3. ICHQ8 Pharmaceutical development. Available at: <http://www.ich.org>.
4. ICHQ9 Risk Quality Management. Available at: <http://www.ich.org>.
5. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Available at: <http://www.ich.org>.
6. ICH Q11 Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities). Available at: <http://www.ich.org>.
7. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human. Available at: <http://www.apteka.ua/article/296331>.
8. Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
9. Commission Directive 2005/28/EC of 8 April 2005 laying down principles and detailed guidelines for good clinical practice as regards investigational medicinal products for human use, as well as the requirements for authorisation of the manufacturing or importation of such products. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
10. Regulation (EU) No 536/2014 of the European Parliament and of the Council of 16 April 2014 on clinical trials on medicinal products for human use, and repealing Directive 2001/20/EC. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>.
11. Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html> (accessed 3.05.2018).
12. Commission Regulation (EC) No 540/95 of 10 March 1995 laying down the arrangements for reporting suspected unexpected adverse reactions which are not serious, whether arising in the Community or in a third country, to medicinal products for human or veterinary use authorized in accordance with the provisions of Council Regulation (EEC) No 2309/93. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>.
13. Regulation (EC) No 596/2009 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
14. Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EEC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004 (consolidated version: 26/01/2007). Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.

15. Hilts P. J. Protecting America's Health: The FDA, Business, and One Hundred years of Regulation and sources therein. 2003; 55: 46.
16. Велданова М. С 1 января в ЕАЭС стартует единый рынок лекарств. 2016. Available at: [www.gmpnews.ru/2016/01/eaes-sozdayot-edinyj-rynok-obrashheni-ya-lekarstv-medizdelij-i-texniki](http://www.gmpnews.ru/2016/01/eaes-sozdayot-edinyj-rynok-obrashheni-ya-lekarstv-medizdelij-i-texniki).
17. Гаврилов Д., Ращевский Е. Единый рынок лекарственных средств на территории ЕАЭС. 2016. Available at: <http://epam.ru/rus/legal-updates/view/edinyi-rynok-lekarstvennyh-sredstv-na-territorii-eaes>.
18. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_pravila-registracii-lekarstvennih-sredstv.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_pravila-registracii-lekarstvennih-sredstv.pdf).
19. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_pravila-GMP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_pravila-GMP.pdf).
20. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 79 «Правила надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_GCP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_GCP.pdf).
21. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_issledovaniya-bioekvivalentnosti.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_issledovaniya-bioekvivalentnosti.pdf).
22. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 89 «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_issledovaniya-biologicheskikh-Ls.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_issledovaniya-biologicheskikh-Ls.pdf).
23. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 80 «Правила надлежащей дистрибуторской практики в рамках Евразийского экономического союза». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_GDP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_GDP.pdf).
24. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 81 «Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_GLP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_GLP.pdf).
25. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 87 «Правила надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_farmakonadzor.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_farmakonadzor.pdf).
26. Быковский С. Н., Василенко И. А., Н. Демина Н. Б. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. – М.: Изд-во Леро. 2015; 472.
27. Демина Н. Б. Фармацевтическая разработка: обзор оборудования для лабораторной разработки и наработки опытных партий твердых лекарственных форм. *Регистрация и разработка лекарственных средств*. 2016; 1(14): 38–46.
28. Лин А. А., Соколов Б. И., Слепнев Д. М. Фармацевтический рынок: производство лекарственных средств в России. *Проблемы современной экономики*. 2013; 1(45): 191–195.
29. Наркевич И. А., Трофимова Е. О., Дельви-Каменская Т. Ю. Проблема подготовки кадров для российской фармацевтической отрасли и пути ее преодоления. *Инновации*. 2013; 7(177): 3–8.
30. Наркевич И. А. Инвестиции в научные исследования и разработки на глобальном фармацевтическом рынке. *Фармация*. 2017; 66(3): 3–72017. 66(3): 3–7.
31. Потапчик Е. Г., Попович Л. Д. Анализ мирового опыта отбора проектов, реализуемых посредством государственно-частного партнерства в сфере здравоохранения. *Здравоохранение*. 2015; 8: 66–75.
32. Пятигорская Н. В., Береговых В. В., Мешковский А. П., Пятигорский А. М., Быков А. В. Организация производства и контроля качества лекарственных средств. – М.: Издательство РАМН. 2013: 648.
33. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ методов используемых при разработке фармацевтических субстанций. *Научно-практический журнал Фармация, специальный выпуск: «Сборник конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»*. 2018: 159–161.
34. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ системы организации фармацевтической разработки лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 3(20): 170–178.
35. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Использование стандарта IDEF0 при подготовке к фармацевтической разработке. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 4(21): 270–276.
36. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Использование стандарта IDEF0 на этапе планирования фармацевтической разработки. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ. 2017; 3(20): 216–220.
37. Методологии функционального моделирования РД IDEF0. *Издательство стандартов*. 2000: 75.
38. Федеральный закон № 61-ФЗ от 24.03.2010 «Об обращении лекарственных средств». Available at: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_99350/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/)
39. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики». Available at: <http://www.vgn.ru/assets/files/normativy/916.pdf>.

## REFERENCES

1. Ende D. J. Production of medicines. Chemical technology from R&D to production. – Saint Petersburg: *Profession*. 2015: 1280 (in Russ.).
2. Watson T. N. J., Nosal R., am Ende D., Bronk K., Mustakis J., O'Connor G., Santa Maria C. L. J. Pharmaceut. *Innovation*. 2007; 2(3-4): 71.
3. ICHQ8 Pharmaceutical development. Available at: <http://www.ich.org>.
4. ICHQ9 Risk Quality Management. Available at: <http://www.ich.org>.
5. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Available at: <http://www.ich.org>.
6. ICH Q11 Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities). Available at: <http://www.ich.org>.
7. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human. Available at: <http://www.apteka.ua/article/296331>.
8. Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
9. Commission Directive 2005/28/EC of 8 April 2005 laying down principles and detailed guidelines for good clinical practice as regards investigational medicinal products for human use, as well as the requirements for authorisation of the manufacturing or importation of such products. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>
10. Regulation (EU) No 536/2014 of the European Parliament and of the Council of 16 April 2014 on clinical trials on medicinal products for human use, and repealing Directive 2001/20/EC. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
11. Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html> (accessed 3.05.2018).
12. Commission Regulation (EC) No 540/95 of 10 March 1995 laying down the arrangements for reporting suspected unexpected adverse reactions which are not serious, whether arising in the Community or

- in a third country, to medicinal products for human or veterinary use authorized in accordance with the provisions of Council Regulation (EEC) No 2309/93. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>.
13. Regulation (EC) No 596/2009 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
  14. Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EEC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004 (consolidated version: 26/01/2007). Available at: <http://eurlex.europa.eu/homepage.html>.
  15. Hilts P. J. Protecting America's Health: The FDA, Business, and One Hundred years of Regulation and sources therein. 2003; 55: 46.
  16. Veldanova M. From January 1 in the EAEU starts a single market of drugs. 2016. Available at: [www.gmpnews.ru/2016/01/eaes-sozdayot-edinyj-rynok-obrashheniya-lekarstv-medizdelij-i-texniki](http://www.gmpnews.ru/2016/01/eaes-sozdayot-edinyj-rynok-obrashheniya-lekarstv-medizdelij-i-texniki).
  17. Gavrilov D., Rashevsky E. Single market of medicines on the territory of the EAEU. 2016. Available at: <http://epam.ru/rus/legal-updates/view/edinyj-rynok-lekarstvennyh-sredstv-na-territorii-eaes>.
  18. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission of November 3, 2016, No. 78 «On the rules of registration and examination of medicines for medical use». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_pravila-registracii-lekarstvennih-sredstv.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_pravila-registracii-lekarstvennih-sredstv.pdf).
  19. Decision No. 77 of the Council of the Eurasian economic Commission of 3 November 2016 «On approval of the rules of good manufacturing practice of the Eurasian economic Union». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_pravila-GMP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_pravila-GMP.pdf).
  20. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission dated November 3, 2016, No. 79 «Rules of good clinical practice of the Eurasian economic Union». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_GCP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_GCP.pdf).
  21. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission dated November 3, 2016, No. 85 «Rules for bioequivalence studies of medicines within the Eurasian economic Union». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_issledovaniya-bioekvivalentnosti.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_issledovaniya-bioekvivalentnosti.pdf).
  22. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission of November 3, 2016, No. 89 «Rules for research of biological medicines of the Eurasian economic Union». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_issledovaniya-biologicheskikh-LS.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_issledovaniya-biologicheskikh-LS.pdf).
  23. Decision No. 80 of the Council of the Eurasian economic Commission dated November 3, 2016 «Rules of good distribution practice within the Eurasian economic Union». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_GDP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_GDP.pdf).
  24. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission of November 3, 2016, No. 81 «Rules of good laboratory practice of the Eurasian economic Union in the field of circulation of medicines». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_GLP.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_GLP.pdf).
  25. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission dated November 3, 2016, No. 87 «Rules of good practice of pharmacovigilance of the Eurasian economic Union». Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion\\_lekarstva/EAEU\\_farmakonadzor.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_farmakonadzor.pdf).
  26. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. Scientific and practical guide for the pharmaceutical industry. – M.: Publishing house Pero. 2015: 472 (in Russ.).
  27. Demina N. B. Pharmaceutical development: review of equipment for laboratory development and development of experimental batches of solid dosage forms. *Drug development & registration*. 2016; 1(14): 38–46 (in Russ.).
  28. Lin A. A., Sokolov B. I., Slepnev D. M. Pharmaceutical market: production of medicines in Russia. *Problems of the modern economy*. 2013; 1(45): 191–195 (in Russ.).
  29. Narkevich I. A., Trofimova E. O., Delvig-Kamenskaya T. Yu. The Problem of personnel training for the Russian pharmaceutical industry and ways to overcome it. *Innovations*. 2013; 7(177): 3–8 (in Russ.).
  30. Narkevich I. A., Lin A. A., Denisova E. V. Investments in research and development in the global pharmaceutical market. *Pharmacy*. 2017; 66(3): 3–7. 2017; 66(3): 3–7 (in Russ.).
  31. Potapchik E. G., Popovich L. D. Analysis of the world experience in the selection of projects implemented through public-private partnerships in the health sector. *Health*. 2015; 8: 66–75 (in Russ.).
  32. Pyatigorskaya N. V., Beregovykh V. V., meshkovsky A. P., Pyatigorsky A. M., Bykov A. V. Organization of production and quality control of medicines. – M.: Publishing house RAMS. 2013: 648 (in Russ.).
  33. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. The Analysis of methods used in the development of pharmaceutical substances. *Scientific and practical journal pharmacy, special issue: «Collection of the conference» Young pharmacy-the potential of the future*. 2018: 159–161 (in Russ.).
  34. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. The Analysis of the system of organization of pharmaceutical development of medicines. *Drug development & registration*. 2017; 3(20): 170–178 (in Russ.).
  35. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. Use of IDEF0 standard in preparation for pharmaceutical development. *Drug development & registration*. 2017; 4(21): 270–276 (in Russ.).
  36. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. Use of the IDEF0 standard at the planning stage of pharmaceutical development. Collection of materials of the all-Russian scientific and practical conference with international participation. – Orekhovo-Zuyevo: Editorial and publishing Department of GSTU. 2017; 3(20): 216–220 (in Russ.).
  37. Methodology of functional modeling RD IDEF0. *Standards publishing House*. 2000: 75.
  38. Federal law No. 61-FZ of 24.03.2010 «On circulation of medicines». Available at: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_99350/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/)
  39. Order of the Ministry of industry and trade of Russia of 14.06.2013 No. 916 (ed. of 18.12.2015) «On approval of the Rules of good manufacturing practice». Available at: <http://www.vgnki.ru/assets/files/normativy/916.pdf>.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31>  
УДК 615.014.21



Обзорная статья/Review article

## Перспективы использования медицинских глин (обзор)

А. В. Бондарев<sup>1\*</sup>, Е. Т. Жиликова<sup>1</sup>, Н. Б. Демина<sup>2</sup>, Е. Ю. Тимошенко<sup>1</sup>

1 – ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), кафедра фармацевтической технологии, 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

\*Корреспондентское лицо: Бондарев Александр Васильевич. E-mail: alexbond936@yandex.ru

Статья получена: 04.10.2019. Статья принята к печати: 11.11.2019

### Резюме

**Введение.** В статье рассмотрены аспекты использования медицинских глин в фармацевтической технологии. Проведен обзор традиционных направлений применения медицинских глин, а также выделены новые направления.

**Текст.** Одной из основных проблем отечественной промышленной фармации является узкая номенклатура активных фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ. Восполнение номенклатуры происходит двумя путями – посредством синтеза новых химических соединений или за счет переработки природного сырья животного, растительного или минерального происхождения. В процессе очистки и переработки минерального сырья получают медицинские глины, которые в настоящее время находят широкое применение в качестве активных фармацевтических субстанций для производства энтеросорбентов, а также в качестве вспомогательных веществ.

**Заключение.** Проведенный обзор перспектив и направлений использования медицинских глин показал, что в настоящее время медицинские глины используются в трех традиционных направлениях: наружное применение, применение *per os*, применение в фармацевтической и пищевой технологии. Перспективным направлением является применение медицинских глин в качестве транспортных лекарственных систем. Исследование данного информационного массива и его обобщение имеет несомненную практическую и научную значимость в современной фармацевтической технологии.

**Ключевые слова:** медицинская глина, лекарственное минеральное сырье, вспомогательное вещество.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Все авторы занимались сбором и обобщением информационного массива направлений использования медицинских глин, авторы А. В. Бондарев и Е. Т. Жиликова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Для цитирования:** Бондарев А. В., Жиликова Е. Т., Демина Н. Б., Тимошенко Е. Ю. Перспективы использования медицинских глин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 27–31.

## Prospects for the Use of Medical Clays (Review)

Alexander V. Bondarev<sup>1\*</sup>, Elena T. Zhilyakova<sup>1</sup>, Natalya B. Demina<sup>2</sup>, Elena Yu. Timoshenko<sup>1</sup>

1 – Belgorod National Research University, Department of pharmaceutical technology, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Alexander V. Bondarev. E-mail: alexbond936@yandex.ru

Received: 04.10.2019. Accepted: 11.11.2019

### Abstract

**Introduction.** The article deals with the aspects of the use of Medical Clays in Pharmaceutical Technology. A review of the traditional areas of application of Medical Clay, as well as highlighting new directions.

**Text.** One of the main problems of domestic industrial pharmacy is a narrow nomenclature of active pharmaceutical substances and excipients. Replenishment of the nomenclature occurs in two ways—through the synthesis of new chemical compounds or through the processing of natural raw materials of animal, plant or mineral origin. In the process of purification and processing of mineral raw materials, Medical Clays are obtained, which are now widely used as active pharmaceutical substances for the production of Enterosorbents, as well as auxiliary substances.

**Conclusion.** A review of perspectives and areas of use of Medicinal Clays have shown that at present, Medical Clays used in the three traditional areas: cutaneous application, application *per os*, application in pharmaceutical and food technology. A promising direction is the use of Medical Clays as transport drug systems. The study of this information array and its generalization has undoubted practical and scientific significance in modern pharmaceutical technology.

**Keywords:** Medical Clay, Medicinal Mineral Raw Materials, Excipient.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** All authors collected and generalized the information array of the directions for using medical clays, the authors Alexander V. Bondarev and Elena T. Zhilyakova participated in the writing of the article. All authors participated in the discussion of the results.

**For citation:** Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Timoshenko E. Yu. Prospects for the use of medical clays. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 27–31.

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем отечественной промышленной фармации является узкая номенклатура активных фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ. Доля отечественных лекарственных средств (фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов) в общей номенклатуре зарегистрированных лекарственных средств в России составляет 55,1 %, что указывает на зависимость лекарственного обеспечения России от зарубежных производителей [1]. Восполнение номенклатуры происходит двумя путями – посредством синтеза новых химических соединений или за счет переработки природного сырья животного, растительного или минерального происхождения. В процессе очистки и переработки минерального сырья получают медицинские глины, которые в настоящее время находят широкое применение в качестве активных фармацевтических субстанций для производства энтеросорбентов, а также в качестве вспомогательных веществ, улучшающих технологические показатели лекарственной формы. Однако применение медицинских глин не ограничивается только данными направлениями. Исследование перспектив использования медицинских глин, их обобщение и систематизация имеет несомненную практическую и научную значимость в современной фармацевтической технологии.

В качестве материалов исследования использовали электронные ресурсы *eLIBRARY*, *CyberLeninka*, *PubMed*. Методы исследования – анализ и обобщение. Исследование охватило научную литературу за период с 1969 года по настоящее время.

В историческом аспекте глины как терапевтические средства использовались на всем протяжении существования человечества. Начиная с XX века, глины подвергаются физико-химическому исследованию, обосновывается их терапевтическое действие и практическое применение в фармации и медицине [2–4]. Всестороннее изучение глин, актуальных для использования в фармацевтической технологии, изучались российскими (Сало Д. П., 1969 г.; Цагарейшвили Г. В., 1986 г.; Халифаев Д. Р., 2004 г.; Жиликова Е. Т., 2012 г.; Мизина П. Г., 2017 г.) и зарубежными учеными [5–9].

Термин «медицинские глины» впервые употребили французские ученые (Триа Ж. М., Жером М. С., Дюбук Ж. П., 2006 г.). В настоящее время нами выделены следующие традиционные направления использования медицинских глин, а также перспективы применения, представленные на рисунке 1.

Первое направление использования медицинских глин – путем нанесения на кожу и раневую поверхность (корнеотерапия и вульнеросорбция). Корнеотерапия, как раздел современной косметологии, занимается теорией и практикой методами ухода за кожей, направленных на восстановление и защиту ее

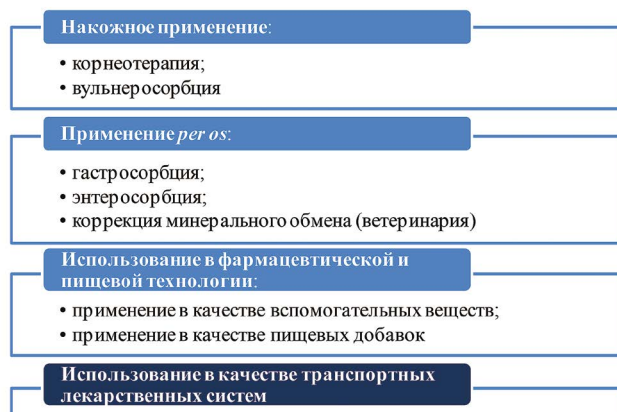


Рисунок 1. Направления и перспективы использования медицинских глин

Figure 1. Directions and prospects for the use of Medical Clays

барьерных систем [10–12]. Косметическое аппликационное применение глины является одним из методов корнеотерапии. Наружное использование медицинских глин нормализует целостность рогового слоя. Действие глины достигается за счет термического, механического и восстанавливающих эффектов. Термический эффект глины, нагретой до 40 °С, способствует расширению периферических сосудов. Возникшая гиперемия усиливает обмен веществ в поверхностных тканях и оказывает антиспазматическое действие. Механическое действие заключается в давлении массы глины на кожу, растяжении кожи и отшелушивающем эффекте. Раздражающее действие глины обусловлено ее минералогическим составом, включающем комплекс химических элементов.

Вульнеросорбция в настоящее время находит широкое применение в хирургической практике. Метод лечения основан на сорбции токсикантов через раневую поверхность. Основными требованиями к таким материалам – возможность защиты ран от внешней среды, повышенная ад- и абсорбционная емкость. При наложении медицинской глины происходит очистка раневого содержимого и ускоряется транспорт токсических веществ из крови с их последующей сорбцией. Для вульнеросорбции используются стерильные медицинские глины. Непременным условием проведения вульнеросорбции является возможность удаления всей массы глины из раны. При лечении поверхностных поражений это достигается путем использования глины в специальных контейнерах из проницаемой мембраны для миграции экссудата и токсических веществ [13–15].

Второе направление использования медицинских глин – это гастроэнтеросорбция – поглощение сорбентом токсических веществ в желудке и кишечнике. Сорбент вводится в дозе 100–200 мг/кг массы тела. Применяется в первые сутки отравления три раза. Метод позволяет сорбировать токсические экзотоксины,

которые находятся в желудочно-кишечном тракте или эндотоксины, повторно выделившиеся в его просвет. Желудок является резервуаром, содержащим токсические вещества экзогенного происхождения и, в то же время, совместно с кишечником, в котором накапливаются токсины, поступившие из внешней среды и, выделяющиеся слюнными железами (10–30 мл/кг), железами желудка (30–35 мл/кг), поджелудочной железы (25–30 мл/кг), билиарной системой (10–15 мл/кг), кишечником (25–30 мл/кг), в результате происходит возврат экзо- и эндотоксинов в сосудистый резервуар с последующим нарастанием интоксикации. Гастроэнтеросорбционное действие медицинских глин основано на высоких показателях их удельной поверхности, ионообменной способности, стабилизации слизистого барьера желудочно-кишечного тракта, связывании токсинов во всех его отделах при приеме *per os* [16–17]. Фармакологическое действие медицинских глин антидиарейное, адсорбционное, обволакивающее и гастропротективное [18]. За счет адсорбции токсинов глинами и предотвращения их всасывания уменьшается метаболическая нагрузка на органы детоксикации и экскреции, улучшаются гуморальная среда организма и иммунный статус [9, 19]. Обволакивающая способность оказывает положительное влияние на биоценоз толстого кишечника [20]. При приеме медицинских глин при энтероколитах наблюдается противовоспалительный эффект [21–22]. Ионнообменная способность глин обеспечивает коррекцию биологически важных катионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . В настоящее время восполнение минеральных веществ при помощи медицинских глин находит широкое применение в ветеринарной практике [23–24].

Третье направление использования медицинских глин – это применение в качестве вспомогательных веществ в фармацевтической технологии и в качестве пищевых добавок. До недавнего времени к вспомогательным веществам предъявляли требования фармакологической и химической индифферентности. Однако выяснилось, что эти вещества могут в значительной степени влиять на фармакологическую активность лекарственных веществ: усиливать действие лекарственных веществ или снижать их активность, изменять характер действия под влиянием разных причин, а именно комплексобразования, молекулярных реакций, сорбции [25–26]. Медицинские глины при использовании в качестве вспомогательных веществ из-за сорбционных свойств в некоторых случаях могут регулировать константы фармакокинетики и фармакодинамики, тем самым повышая эффективность лекарственной терапии [27].

Все вспомогательные вещества классифицируют: по происхождению, химической структуре и в зависимости от влияния на физико-химические характеристики и фармакокинетику лекарственных форм. Медицинские глины относят к неорганическим вспомо-

гательным веществам. Они оказывают стабилизирующее, формообразующее, пролонгирующее, корригирующее, эмульгирующее действие на лекарственную форму, повышают вязкость суппозиторных основ [28–30]. Для получения обратных эмульсий типа «вода в масле» все большее применение находят монтмориллонитовые медицинские глины [31–32].

Медицинские глины являются природными вспомогательными веществами и имеют преимущество по сравнению с синтетическими из-за малой токсичности. В Российской Федерации каолиновые и монтмориллонитовые глины разрешены для применения в качестве носителя-наполнителя, в качестве осветляющего, фильтрующего материала, флокулянта, сорбента в крахмалопаточном, сахарном, соковом производств, маслоделии, виноделии [33].

Перспективой использования медицинских глин является их применение в качестве транспортных лекарственных систем. Транспортные лекарственные системы являются инновационным направлением в фармацевтической технологии. Сорбционные свойства на субмикронном уровне способствуют связыванию, транспорту и выделению лекарственной молекулы. Медицинская глина в данном случае выступает в качестве переносчика лекарственной молекулы с последующей ее доставкой к месту назначения посредством десорбции [34–36].

Технологические методы модификации рассматривают сорбционные лекарственные системы, в которых лекарственное вещество физически или химически связано с твердым минеральным носителем с целью модифицирования его высвобождения при последующей десорбции [37]. Существует несколько способов получения сорбционных лекарственных систем:

1. Совместное диспергирование лекарственного вещества с твердым минеральным носителем в мельницах различного типа.
2. Смешивание лекарственного вещества с твердым минеральным носителем в среде растворителя с последующим удалением растворителя выпариванием [38].

Сорбционная лекарственная система с твердым минеральным носителем увеличит стабильность лекарственной формы, позволит уменьшить дозировку и частоту введения лекарственного вещества [39–40]. В данном аспекте биофармацевтические исследования по созданию транспортных лекарственных систем с твердым минеральным носителем приобретают особую актуальность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен обзор перспектив и направлений использования медицинских глин. В настоящее время медицинские глины используются в четырех направлениях: накожное применение, применение *per os*, применение в фармацевтической и пищевой техно-

логии, применение в качестве транспортных лекарственных систем. Исследование данных направлений, обобщение и систематизация имеет несомненную практическую и научную значимость в современной фармацевтической технологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (accessed 30.09.2019).
2. Везенцев А. И., Дудина С. Н., Везенцев А. А. Разработка энтеросорбента на основе глин Белгородской области. *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки*. 2006; 3(23): 55–59.
3. Аминов С. Н. Создание и фармакотерапевтическое исследование противодиарейного препарата на основе монтмориллонитовых глин Узбекистана. *Человек и лекарство*. 2004; 755–756.
4. Жилиякова Е. Т., Новиков О. О., Бондарев А. В., Фролов Г. В. Определение технологических и адсорбционных показателей медицинских глин. *Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация*. 2013; 18(161): 229–234.
5. Сало Д. П., Овчаренко Д. П., Круглицкий Н. Н. Высокодисперсные минералы в фармации и медицине. 1969: 232.
6. Zhilyakova E. T., Bondarev A. V., Bojko N. N., Naplekov D. K. Physical research of porosity of mineral sorbents. *Journal of International Pharmaceutical Research*. 2018; 45: 477–480.
7. Цагарейшвили Г. В. Технологические аспекты повышения биологической доступности действующих веществ из лекарственных средств. 1986: 167.
8. Кормишина А. Е., Мизина П. Г., Кормишин В. А. Исследование возможности использования природных минеральных глин в фармации. *Теоретические и практические аспекты современной медицины*. 2017; 1(1): 48–52.
9. Триа Ж. М., Марсель С. Ж., Дюбек Ж. П. Терапевтическое применение медицинских глин в гастроэнтерологии. *Болезни органов пищеварения*. 2006; 8(1): 35–38.
10. Stanley J.R., Albert M., Kligman. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006; 126: 697–698.
11. Козулин Е. Е., Козулин Е. А. Фитоминеральная корнеотерапия в реабилитации детей с atopическим дерматитом. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2015; 2: 58–61.
12. Norman R. A., Kligman A. M. Diagnosis Aging Skin Diseases. 2008: 339.
13. Fong J., Wood F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1(4): 441–449.
14. Игнатьева Ю. А., Успенская М. В., Борисов О. В., Олехнович Р. О., Евсеев Р. А., Касанов К. Н. Исследование сорбционных характеристик полимерных минералонаполненных композитов для медицины. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2014; 93: 52–56.
15. Касанов К. Н., Попов В. А., Евсеев Р. А., Андреев В. А., Везенцев А. И., Пономарева Н. Ф., Игнатьева Ю. А., Успенская М. В., Хрипунов А. К. Модифицированный серебром монтмориллонит: получение, антимикробная активность и медицинское применение в биоактивных раневых покрытиях. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2013; 18: 188–197.
16. Бабаян М. Л. Применение Смекты в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта. *Русский медицинский журнал*. 2004; 16: 972–975.
17. Phillips T. D., Lemke S. L., Grant P. G. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2002; 504: 157–171.
18. Крамарев С. А., Евтушенко В. В., Корбут Е. В. Применение препарата смекта и РПР HUMANA ELECTROLYT в комплексном лечении детей с острыми кишечными инфекциями. *Современная педиатрия*. 2011; 4(38): 134–138.
19. Marroquin-Cardona A. Characterization and Safety of Uniform Particle Size NovaSil Clay as a Potential Aflatoxin Enterosorbent. *Applied Clay Science*. 2011; 54(3–4): 248–257.
20. Эйриш М. В. Кристаллохимические и структурные особенности монтмориллонита и их влияние на свойства бентонитовых глин. *Бентониты*. 1980; 117–125.
21. Liaschenko N. V. Peculiarities of enterosorption via nasointestinal probe using sorbent diosmectite. *Klin. Khir.* 2014; 12: 16–18.
22. Zychowski K.E. Mitigation of colitis with NovaSil clay therapy. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60(2): 382–392.
23. Везенцев А. И., Трубицын М. А., Романщак А. А. Сорбционно-активные породы Белгородской области. *Горный журнал*. 2004; 1: 51–52.
24. Везенцев А. И., Королькова С. В., Буханов В. Д. Тектурные характеристики и сорбционные свойства природной и магний-замещенной монтмориллонит содержащей глины. *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки*. 2010; 9(80): 119–123.
25. Арзамасцев А. П., Садчикова Н. П., Титова А. В. Современный подход к анализу и стандартизации вспомогательных веществ. *Вопросы биологической и медицинской химии*. 2009; 2: 14–23.
26. Спирер Ж.-М. Система допуска фармацевтических ингредиентов к использованию в производстве лекарственных средств. *Гармонизация требований*. 2008: 46–49.
27. Капсальмова Э. Н., Ерекшова Г. К., Сакипова З. Б. Возможности бентонитов в разработке лекарственных форм. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2014; 5: 60–62.
28. Симакина А. А., Мизина П. Г. Сравнительное изучение сорбционных свойств некоторых вспомогательных веществ. *Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы*. 2010; 2: 180–182.
29. Bourbigot S. Investigation of Nanodispersion in Polystyrene-Montmorillonite Nanocomposites by Solid-State NMR. *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics*. 2003; 41: 3188–3213.
30. Viserasa C., Lopez-Galindob A. Pharmaceutical applications of some spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies. *Applied Clay Science*. 1999; 14(1–3): 69–82.
31. Ходжава М. В. Влияние скользящих веществ на качество таблетирования лекарственных средств. *Фармация*. 2011; 7: 31–33.
32. Тишков Т. М., Погребняк А. В., Погребняк Л. В. Современные вспомогательные вещества. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 2–1. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22742> (accessed 30.09.2019).
33. СанПиН 2.3.2.1293-03 «Гигиенические требования по применению пищевых добавок» п. 3.16.5. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/901862338> (accessed 28.09.2019).
34. Pillai J. J., Thulasidasan A. K. T., Anto R. J., Chithralekha D. N., Narayanan A., Kumar G. S. V. Folic acid conjugated cross-linked acrylic polymer (FA-CLAP) hydrogel for site specific delivery of hydrophobic drugs to cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*. 2014; 1: 25.
35. Игнатьева Ю. А., Успенская М. В., Борисов О. В., Олехнович Р. О., Евсеев Р. А., Касанов К. Н. Исследование сорбционных характеристик полимерных минералонаполненных композитов для медицины. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2014; 5(93): 52–56.
36. Симакина А. А., Мизина П. Г., Решетникова В. П. Высвобождение фурацилина из экспериментальных составов сорбционных лекарственных форм на основе Ундровской лечебной голубой глины. *Перспективные разработки науки и техники*. 2011; 39–44.
37. Бондарев А. В., Жилиякова Е. Т. Использование сорбционных процессов в технологии систем доставки лекарственных веществ. *Фармация и фармакология*. 2019; 7(1): 4–12. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-1-4-12.
38. Бондарев А. В., Жилиякова Е. Т., Демина Н. Б., Новиков В. Ю. Исследование морфологии сорбционных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 33–37. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-33-37.
39. Сысуев Б. Б., Плетнева И. В. Современное состояние исследований разработок в области инновационных лекарственных форм и их модификаций. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2014; 4(52): 7–12.
40. Алексеев К. В., Тихонова Н. В., Блынская Е. В., Карбушева Е. Ю., Турчинская К. Г., Михеева А. С., Алексеев В. К., Уваров Н. А. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; 4: 43–47.

## REFERENCES

1. The state register of medicines. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (accessed 09/30/2019) (in Russ.).
2. Vezentsev A. I., Dudina S. N., Vezentsev A. A. Development of enterosorbent based on clays of the Belgorod region. *Scientific statements of BelSU. Series: Natural Sciences*. 2006; 3(23): 55–59 (in Russ.).
3. Aminov S.N. Creation and pharmacotherapeutic study of antidiarrheal drug navbakhtit based on montmorillonite clays of Uzbekistan. *Man and medicine*. 2004; 755–756 (in Kazakhstan).
4. Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Bondarev A. V., Frolov G. V. Determination of technological and adsorption parameters of medical clays. *Scientific reports of BelSU. Series: Medicine. Pharmacy*. 2013; 18(161): 229–234 (in Russ.).
5. Salo D. P., Ovcharenko D. P., Kruglitsky N. N. Fine minerals in pharmacy and medicine. 1969: 232 (in Russ.).
6. Zhilyakova E. T., Bondarev A. V., Bojko N. N., Naplekov D. K. Physical research of porosity of mineral sorbents. *Journal of International Pharmaceutical Research*. 2018; 45: 477–480.
7. Tsagareishvili G. V. Technological aspects of increasing the bioavailability of active substances from drugs. 1986: 167.
8. Kormishina A. E., Mizina P. G., Kormishin V. A. Study of the possibility of using natural mineral clays in pharmacy. *Theoretical and practical aspects of modern medicine*. 2017; 1 (1): 48–52.
9. Tria J. M., Marcel S. Z., Dubouck, J. P. The therapeutic use of medical clays in gastroenterology. *Digestive apparatus diseases*. 2006; 8 (1): 35–38 (in Russ.).
10. Stanley J. R. Albert M. Kligman. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006; 126: 697–698.
11. Kozulin E. E., Kozulin E. A. Phytomineral root therapy in the rehabilitation of children with atopic dermatitis. *Far Eastern Medical Journal*. 2015; 2: 58–61 (in Russ.).
12. Norman R. A., Kligman A. M. Diagnosis Aging Skin Diseases. 2008: 339.
13. Fong J., Wood F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1(4): 441–449.
14. Ignatyeva Yu. A., Uspenskaya M. V., Borisov O. V., Olehnovich R. O., Evseev R. A., Kasanov K. N., Study of sorption characteristics of polymer mineral-filled composites for medicine. *Scientific and technical bulletin of information technologies, mechanics and optics*. 2014; 93: 52–56 (in Russ.).
15. Kasanov K. N., Popov V. A., Evseev R. A., Andreev V. A., Vezentsev A. I., Ponomareva N. F., Ignatieva Yu. A., Uspenskaya M. V., Khripunov A. K. Silver-modified montmorillonite: preparation, antimicrobial activity and medical use in bioactive wound dressings. *Scientific reports of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2013; 18: 188–197 (in Russ.).
16. Babayan M. L. Application Smecta in the treatment of diseases of the gastrointestinal tract. *Russian medical journal*. 2004; 16: 972–975 (in Russ.).
17. Phillips T. D., Lemke S. L., Grant P. G. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2002; 504: 157–171.
18. Kramarev S. A., Evtushenko V. V., Korbut E. V. The use of the drug smecta and RPR HUMANA ELECTROLYT in the complex treatment of children with acute intestinal infections. *Modern pediatrics*. 2011; 4 (38): 134–138 (in Ukr.).
19. Marroquin-Cardona A. Characterization and Safety of Uniform Particle Size NovaSil Clay as a Potential Aflatoxin Enterosorbent. *Applied Clay Science*. 2011; 54 (3–4): 248–257.
20. Irish M. V. Crystal-chemical and structural features of montmorillonite and their influence on the properties of bentonite clays. *Bentonites*. 1980; 117–125 (in Russ.).
21. Liashenko N.V. Peculiarities of enterosorption via nasointestinal probe using sorbent diosmectite. *Klin. Khir.* 2014; 12: 16–18.
22. Zychowski K. E. Mitigation of colitis with NovaSil clay therapy. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60 (2): 382–392.
23. Vezentsev A. I., Trubitsyn M. A., Romanshchak A. A. Sorption-active rocks of the Belgorod region. *Mountain Journal*. 2004; 1: 51–52 (in Russ.).
24. Vezentsev A. I., Korolkova S. V., Bukhanov V. D. Textural characteristics and sorption properties of natural and magnesium-substituted montmorillonite-containing clay. *Scientific statements of BelSU. Series: Natural Sciences*. 2010; 9 (80): 119–123 (in Russ.).
25. Arzamastsev A. P., Sadchikova N. P., Titova A. V. A modern approach to the analysis and standardization of excipients. *Questions of biological and medical chemistry*. 2009; 2: 14–23 (in Russ.).
26. Spieser J.-M. The system of access to pharmaceutical ingredients for use in the manufacture of medicines. *Harmonization of requirements*. 2008: 46–49 (in Russ.).
27. Kapsalyamova E. N., Erekesheva G. K., Sakipova Z. B. Possibilities of bentonites in the development of dosage forms. *Bulletin of the Kazakh National Medical University*. 2014; 5: 60–62 (in Kazakhstan).
28. Simakina A.A., Mizina P.G. A comparative study of the sorption properties of some auxiliary substances. *Medical and social ecology of the individual: state and prospects*. 2010; 2: 180–182 (in Russ.).
29. Bourbigot S. Investigation of Nanodispersion in Polystyrene-Montmorillonite Nanocomposites by Solid-State NMR. *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics*. 2003; 41: 3188–3213.
30. Viserasa C., Lopez-Galindob A. Pharmaceutical applications of some spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies. *Applied Clay Science*. 1999; 14 (1–3): 69–82.
31. Khojava M. V. The effect of moving substances on the quality of tableting drugs. *Pharmacy*. 2011; 7: 31–33 (in Russ.).
32. Tishkov T. M., Pogrebnyak A. V., Pogrebnyak L. V. Modern excipients. *Modern problems of science and education*. 2015; 2-1. Available at: <https://science-education.ru/en/article/view?Id=22742> (accessed 09/30/2019) (in Russ.).
33. SanPiN 2.3.2.1293-03 «Hygienic requirements for the use of food additives» p. 3.16.5. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/901862338> (accessed 09/28/2019) (in Russ.).
34. Pillai J. J., Thulasidasan A. K. T., Anto R. J., Chithralekha D. N., Narayanan A., Kumar G. S. V. Folic acid conjugated cross-linked acrylic polymer (FA-CLAP) hydrogel for site specific delivery of hydrophobic drugs to cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*. 2014; 1: 25.
35. Ignatyev Yu. A., Uspenskaya M. V., Borisov O. V., Olehnovich R. O., Evseev R. A., Kasanov K. N. Study of the sorption characteristics of polymer mineral-filled composites for medicine. *Scientific and technical bulletin of information technologies, mechanics and optics*. 2014; 5 (93): 52–56 (in Russ.).
36. Simakina A. A., Mizina P. G., Reshetnikova V. P. The release of furatsilin from experimental formulations of sorption dosage forms based on the Undorov therapeutic blue clay. *Promising developments in science and technology*. 2011; 39–44 (in Russ.).
37. Bondarev A. V., Zhilyakova E. T. The use of sorption processes in the technology of drug delivery systems. *Pharmacy and pharmacology*. 2019 7 (1): 4–12. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-1-4-12 (in Russ.).
38. Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Novikov V. Yu. Study of the morphology of sorption substances. *Drug development & registration*. 2019 8 (2): 33–37. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-33-37 (in Russ.).
39. Sysuev B. B., Pletneva I. V. Current status of research developments in the field of innovative dosage forms and their modifications. *Bulletin of Volgograd State Medical University*. 2014; 4 (52): 7–12 (in Russ.).
40. Alekseev K. V., Tikhonova N. V., Blynskaya E. V., Karbusheva E. Yu., Turchinskaya K. G., Mikheeva A. S., Alekseev V. K., Uvarov N. A. Technology for increasing the biological and pharmaceutical availability of drugs. *Bulletin of new medical technologies*. 2012; 4: 43–47 (in Russ.).

## Реальные условия работы фармацевтов-служащих в начале XX в. (обзор)

К. С. Гузев<sup>1\*</sup>

1 – АО «Ретиноиды», 143989, Россия, Московская обл., мкр. Керамик, г. Балашиха, ул. Свободы, д. 1А, оф. 404

\*Контактное лицо: Гузев Константин Сергеевич. E-mail: guzev3@yandex.ru

Статья получена: 16.09.2019. Статья принята к печати: 29.10.2019

### Резюме

**Введение.** В начале XX в. в фармацевтическом сообществе России существовало множество проблем. На страницах специальной печати обсуждению подлежали такие проблемы как организация аптечных учреждений (аптек, складов, магазинов, производств), направления и перспективы развития отечественной фармацевтической отрасли, её информационное обеспечение, взаимоотношения внутри фармацевтического сообщества, история развития мировой и отечественной фармацевтической науки. Однако всё чаще предметом обсуждения становились вопросы, связанные с фактом крайне тяжёлого положения фармацевтов-служащих.

**Текст.** В работе представлен анализ доклада Б. Н. Салтыкова «К вопросу о необходимости сокращения рабочего дня в аптеках». В нём автор представил детальный и беспристрастный анализ деятельности аптечных учреждений начала XX в., обобщил и сформулировал претензии фармацевтов к государственным департаментам, владельцам аптек и ко всему фармацевтическому сообществу, обосновав, в частности, необходимость сокращения продолжительности рабочего дня аптечных служащих.

**Заключение.** Детальное изучение содержания доклада Б. Н. Салтыкова ведёт к отчётливому пониманию остроты вопросов, связанных с неудовлетворительными условиями труда и быта фармацевтов-служащих, работавших в аптеках России на рубеже XIX и XX столетий. Для решения этой проблемы и налаживания нормальной работы и жизни фармацевтов-служащих необходим, как бы сейчас сказали, системный подход. Кроме 8-часовой смены и нормирования дежурств требовались перемены на всех уровнях фармацевтического образования, изменения в законодательной сфере, необходимы были поиск консенсуса между фармацевтами-владельцами и фармацевтами-служащими, соответствующая охрана труда фармацевта и улучшение их быта, и, самое главное, изменения в отношении общества к фармацевту, то есть поднятие престижа этой профессии.

**Ключевые слова:** фармацевтическое сообщество, рабочий день, аптека, условия труда, быт фармацевта.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Идея написания статьи, сбор материала, его обработка, обобщение, систематизация, формирование концепта, подготовка первичного и окончательного вариантов текста принадлежит Гузеву К. С.

**Для цитирования:** Гузев К. С. Реальные условия работы фармацевтов-служащих в начале XX в. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 32–37.

## Real Work Conditions of Pharmaceutic Servants at the Beginning of the XX Century (Review)

Konstantin S. Guzev<sup>1\*</sup>

1 – JSC «Retinoids», off. 404, 1A, Svobody str., Balashikha, Ceramic microdistrict, Moscow Region, 143983, Russia

\*Corresponding author: Konstantin S. Guzev. E-mail: guzev3@yandex.ru

Received: 16.09.2019. Accepted: 29.10.2019

### Abstract

**Introduction.** At the beginning of the twentieth century in the pharmaceutical community of Russia there were many problems. On the pages of the special press, such problems as the organization of pharmacy institutions (pharmacies, warehouses, shops, manufactures), directions and prospects for the development of the domestic pharmaceutical industry, its information support, relations within the pharmaceutical community, and the history of the development of world and domestic pharmaceutical science were discussed. However, more and more the subject of discussion was issues related to the fact of the extremely difficult situation of pharmacists-employees.

**Text.** The paper presents an analysis of the report of B. N. Saltykova «On the need to reduce working hours in pharmacies.» In it, the author presented a detailed and impartial analysis of the activities of pharmacies in the early twentieth century, summarized and formulated claims of pharmacists to government departments, pharmacy owners and the entire pharmaceutical community, substantiating, in particular, the need to reduce the working hours of pharmacy employees.

**Conclusion.** A detailed study of the contents of the report B. N. Saltykova leads to a clear understanding of the acuteness of issues related to unsatisfactory working and living conditions of pharmacists serving in Russian pharmacies at the turn of the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries. To solve this problem and establish normal work and life for pharmacists, a systematic approach is needed, as they would say now. In addition to the 8-hour shift and standardization of duties, changes were required at all levels of pharmaceutical education, changes in the legislative sphere, the search for consensus between the pharmacists-owners and pharmacists-employees, the appropriate labor protection of the pharmacist and the improvement of their life, and, most importantly, changes in society's attitude to the pharmacist, that is, raising the prestige of this profession.

**Keywords:** pharmaceutical community, working day, pharmacy, working conditions, life of a pharmacist.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** The idea of writing an article, collecting material, processing it, generalizing, systematizing, forming a concept, preparing the primary and final versions of the text belongs to Konstantin S. Guzev.

**For citation:** Guzev K. S. Real work conditions of pharmaceutic servants at the beginning of the xx century. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 32–37.

## ВВЕДЕНИЕ

В процессе работы над предыдущей публикацией, посвящённой состоянию научной и практической фармации в России конца XIX – начала XX вв., у нас сложилось впечатление об удовлетворительном положении дел в этой отрасли медицины в рассматриваемый период [1]. Однако дальнейшее «погружение» в тему показало, что это не вполне соответствует действительности. На самом деле в фармацевтическом сообществе того времени существовало множество проблем, постоянно освещаемых на страницах специальной печати. Обсуждению подлежали организация аптечных учреждений (аптек, складов, магазинов, производств), направления и перспективы развития отечественной фармацевтической отрасли, информационное обеспечение специалистов, взаимоотношения внутри фармацевтического сообщества (между владельцами аптек, фармацевтами-служащими, врачами), история развития мировой и отечественной фармацевтической науки, условия жизни фармацевтов в России и за рубежом и др. В начале XX в. всё чаще предметом обсуждения становились вопросы, связанные с фармацевтическим образованием и фактом крайне тяжёлого положения фармацевтов-служащих. В представленной работе будет сделана попытка рассказать современному читателю, в каких условиях сто с лишним лет назад работали фармацевты в аптеках России.

**Цель работы:** на основании данных литературы охарактеризовать реальные условия работы и быта фармацевтов-служащих в российских аптеках начала XX в.

В конце 1899 г. – начале 1900 г., состоялся III Всероссийский фармацевтический съезд. Оценивая в основном успешную работу съезда, некоторые авторы отмечали, что в его программе «...не было отведено места для докладов, непосредственно трактующих, о нуждах служащих фармацевтов-служащих. 28 января 1900 г. на собрании членов Высочайше утверждённого Российского Фармацевтического Общества взаимного вспомоществования, секретарь этого общества Б. Н. Салтыков (фармацевт при санитарном бюро Московского Губернского Земства) представил доклад «К вопросу о необходимости сокращения рабочего дня в аптеках», подготовленный к съезду, но не зачитанный [2]. В своём сообщении автор представил детальный и беспристрастный анализ деятельности аптечных учреждений, обобщил и сформулировал претензии фармацевтов к государственным департаментам, владельцам аптек и ко всему фармацевтическому сообществу, в частности, по поводу необходимости сокращения продолжительности рабочего дня аптечных служащих. Он отметил, что аргументы в пользу снижения нагрузки на персонал аптек, высказывались давно и регулярно, однако, на съезде времени для такого доклада не нашлось. Благодаря лишь некоторым кратким сообщениям, этот вопрос всё же был «...решён съездом», но «не в смысле постановления о безотлагательном возбуждении соответствующего хода-

тайства, а лишь в виде пожелания, чтобы содержатели аптек добровольно ввели эту благожелательную реформу, без которой немислим дальнейший прогресс нашего (фармацевтического, *авт.*) сословия, и нашего (фармацевтического, *авт.*) специального дела». Б. Н. Салтыков констатировал, что в конце XIX в. в среде фармацевтов стало проявляться некое движение общественной жизни, которое «дремало доселе». В результате появился ряд капитальных трудов по фармации, возросло количество специальных журналов, были вновь представлены проекты пенсионной кассы и кассы взаимопомощи, учреждено Российское Фармацевтическое Общество. Всё это, по словам докладчика: «...подняло чувство самосознания фармацевтического сословия и оно с ужасом увидело, как далеко позади оно осталось, как чуждо оно прогрессу, как долго и беспробудно оно спало». Таким образом, по мнению Б. Н. Салтыкова, сама жизнь выдвинула вопрос о необходимости реорганизации всего быта русского фармацевта «...сохранившего в себе некоторые средневековые идеалы».

Делая обзор быта российского фармацевта, Б. Н. Салтыков сказал, что под фармацевтом он подразумевает «...безусловно, интеллигентного человека, которому по закону и историческому праву должно быть отведено равное место в ряду представителей других научно-практических профессий». Фармацевту, по его словам: «...сплошь и рядом отказывали в признании его прав, что зависело не от рода его занятий, не от образовательного ценза (архитекторы, художники, дантисты по образовательному цензу стоят не выше фармацевта), а от причин кроющихся в складе жизни фармацевта в его бытовых условиях».

Б. Н. Салтыков указал, что закон Российской Империи от 1857 г. (ст. 248, Св. зак., т. XIII) гласил: «...число помощников в аптеках зависит от степени занятий и от обширности оборота аптеки, и должно соответствовать действительной надобности», при этом непонятно, что подразумевалось под этими словами. В действительности штаты в аптеках были крайне скудными и повсеместно в России фармацевты работали в аптеке по 14 часов в сутки (от 8 ч. утра до 10 ч. вечера), дежурили по 10 и более ночей в месяц. Таким образом, постоянное присутствие фармацевта на службе доходило до 38 и даже более часов. Для подтверждения этих цифр докладчик процитировал статистические данные, полученные им от столичных и провинциальных аптек. В частности, в Ст. Никольской аптеке В. К. Феррейна в Москве был установлен именно такой режим работы при дополнительном условии «...чтобы делу отдавались бы все силы, способности и внимание, какими служащий может располагать». Ученики фармацевта по этим правилам могли иметь всего 26 свободных дней в году. В связи с этим докладчик поставил вопрос: «За что, спрашивается, такое лишение свободы? На такой продолжительный срок можно лишить человека свободы, только за деяния предосудительные, да и то после следствия и суда.»

Далее Б. Н. Салтыков отметил, что в России по примеру Западной Европы и Америки уделялось большое внимание продолжительности рабочего времени на фабриках и заводах. Так, в 1897 г. правительство России законодательно положило начало более гуманному отношению к рабочим; при этом, по словам автора сообщения: «...рядом находился другой труженик, образованный и интеллигентный фармацевт. Но закон и власть не вмешивались в упорядочивание строя аптечной жизни, не интересовались его бытовыми условиями, полагая, вероятно, что он сам, в силу своего интеллектуального развития, сумеет создать для себя жизненные условия достойные культурного человека. Но на деле, к сожалению, видно иное». Аптека, по мнению докладчика, представляет собой в некоторой степени учреждение научное, но по сути она является торговым учреждением, подчинённым законам спроса и предложения, а потому и отношения между владельцами аптек и служащими в них фармацевтами есть отношения работодателя и рабочих с той лишь разницей, что в роли последних в этом случае выступают люди науки. Болью пронизаны слова Б. Н. Салтыкова, что по сложившемуся мнению современная (на обсуждаемый период времени, *авт.*) аптека – это предприятие, организованное по «всем требованиям современной науки; здесь можно получить всё, чем может гордиться просвещённый век; всё, что создал гений человека для борьбы с недугом. Видя внешнюю обстановку, Вы заключаете, что попали в учреждение, охраняющее интересы народного здоровья, призванного служить страдающему человечеству, содействовать его долголетию и предупреждать заболевания. Вы думаете, что оно вызвано к жизни требованиями гигиены с одной стороны и принципами гуманности с другой – увы, Вы ужаснётесь, когда узнаете, что это не так. Современная аптека – это «дом ужасов» для свободных и интеллигентных тружеников-фармацевтов, принуждённых работать по 14 и более часов, дежурить по ночам».

Учитывая специфику работы фармацевта, автор призвал учитывать не только сумму отработанных часов, но также интенсивность и характер этого труда. Другими словами Б. Н. Салтыков указал на необходимость принять во внимание тот факт, что аптечная деятельность есть совокупность «как труда физического, так и труда умственного».

Автор доклада охарактеризовал условия, в которых работали фармацевты-служащие в аптеках на рубеже XIX и XX вв. и к чему приводил такой «каторжный труд»:

1. В течение всего времени на службе фармацевт находился на ногах – стулья во многих аптеках были исключены из инвентаря аптеки.
2. Большая часть рабочего времени у фармацевта проходила в атмосфере «пропитанной всевозможными лекарствами, среди которых многие были весьма вредны при постоянном контакте (нарко-

тические вещества, субстанции, раздражающие дыхательные пути), при практически отсутствующей вентиляции».

3. Следующим условием, отрицательно влияющим на самочувствие фармацевта, являлось частое изменение температуры, связанное с бесконечным открыванием входных дверей и непрерывными хождениями из жаркой лаборатории в холодный подвал.
4. Согласно закону, изданному ещё при Петре I «Фармацевт должен быть всегда присутственен», то есть он постоянно должен был находиться на месте при полном осознании всей «важности возложенных на него обязанностей и строгой ответственности за малейшее упущение, ибо здесь и малое несмотрение великий ущерб учинить может». Фармацевт, утомлённый чрезмерным, непосильным и не в меру продолжительным трудом, испытывал вечный страх перед возможностью допустить ошибку и ощутить строгость закона. Следовательно, он всегда находился в нервном и возбуждённом состоянии, отрицательно отражающимся на его физическом и нравственном самочувствии.
5. Находясь постоянно в переутомлённом (как физически, так и умственно) состоянии, фармацевт через несколько лет терял способность к научным занятиям, ощущал ослабление памяти, испытывал расстройство нервной системы. Он терял любовь к своей профессии и начинал выполнять свои обязанности автоматически.
6. Часто, приходя домой после 14-часового рабочего дня и ночных дежурств, фармацевт валился на постель и засыпал тяжёлым сном с тем, чтобы с раннего утра опять идти в аптеку и снова в течение 14 часов «тянуть ляжку». В этом положении фармацевт не имел никакой возможности взяться за книгу, как специальную, так и художественную.
7. Ночью, во время дежурств усталый труженик, не раздеваясь, ложился на диван и по каждому звонку, должен был вставать и идти отпускать «содовый порошок» или банку «кольдокрема». А после дежурства, на утро, у него был один лишь час, чтобы переодеться и выпить чаю, а затем снова приняться за обычную дневную работу. Таким образом, как было сказано в докладе: «отсутствие необходимого физического отдыха и сна являлось обычным для аптечной жизни, и очевидный вред этого настолько ясен, что не нуждался в комментариях».
8. Было и ещё одно обстоятельство, касающееся ночных дежурств. Во многих аптеках служащим приходится дежурить по несколько недель подряд без какого-либо отдыха. В правилах аптеки господина Феррейна можно было прочесть следующее: «Ночное дежурство распределяется понедельно. Каждый служащий отвечает за свою неделю, не освобождаясь от ответственности ни вследствие болезни, ни под иным предлогом». И это было заявлено в то время, когда исследованиями авторитетных учёных высказывалось пожелание, что «люди семейные, равно

как и слабые, болезненные и не достигшие 25 лет, вовсе не должны допускаться к ночной работе». Следовательно, акцентировал автор: «в наших аптеках следует избавить от ночных дежурств учеников и несовершеннолетних помощников». В крупных городах, в которых есть университеты, к ночным дежурствам целесообразно, по мнению Б. Н. Салтыкова, было бы привлекать дежурящих из контингента учащихся фармацевтов, как это делалось в некоторых странах Европы. Было высказано ещё одно пожелание, способное в некоторой степени облегчить жизнь фармацевтов. Автор предложил закрывать на ночь три четверти всех аптек, информируя население о дежурных в это время аптеках с помощью соответствующих объявлений.

В центральной части доклада Б. Н. Салтыков привёл шокирующие сведения о последствиях тяжёлых условий работы и быта российского фармацевтического сословия. Так, по его словам, у большинства российских фармацевтов-служащих лица отличались болезненностью и измождённостью, также обращало на себя внимание полнейшее отсутствие в штате аптек пожилых и старых фармацевтов, что указывало на их значительную смертность в период до 40-летнего возраста. По материалам архива Московской вспомогательной кассы фармацевтов, было установлено, что большинство фармацевтов, похороненных на средства кассы, умирало именно в возрасте до 40 лет, главным образом от чахотки, сумасшествия или в результате самоубийства. Аналогичная ситуация наблюдалась и в Санкт-Петербурге. Часто потеряв здоровье, фармацевты оставляли свою профессию и меняли её на какое-либо иное занятие, более здоровое и менее утомительное. Если это не удавалось, некоторые из них начинали «искать подкрепление в средствах, возбуждающих энергию и восстанавливающих, хотя и временно, их силы; а постоянное наличие в распоряжении фармацевтов наркотических веществ и алкоголя приводило к злоупотреблению ими, поэтому весьма часто среди фармацевтов встречались морфинисты и алкоголики».

Описанные выше ненормальные условия работы и жизни фармацевтов отражались на состоянии их нервной системы и влияли на характер. Этим объяснялись повышенная возбудимость этих специалистов, их раздражительность, резкость в общении с публикой и друг с другом, безучастное отношение ко всему окружающему, утрата любви и призвания к своему делу и, как итог, ненавистное отношение к своей профессии. Несложно представить себе, как тяжела была жизнь молодого человека, попавшего в среду уже разочарованных и озлобленных товарищей.

Чрезвычайно важным является ещё один аргумент Б. Н. Салтыкова в пользу сокращения рабочего дня. Докладчик заявил, что «реформа эта необходима и с точки зрения народного здоровья и безопасности. Закон строго наказывает фармацевтов за всякого рода ошибки и упущения. Фармацевту вверяется драгоцен-

нейшее из благ – человеческая жизнь. Ответствен ли фармацевт за ошибки, сделанные им в период крайнего переутомления, когда он, как всякий смертный человек, начинает терять способность разумения того, что делает? Ведь он проработал в аптеке 14 часов, приготовив за это время около 100 рецептов, затем без отдыха заступил на ночное дежурство, работая вновь до утра, задремал и, будучи вновь разбужен звонком, в период высшего переутомления совершил роковую ошибку. Мы видим, сколько жизней у него в руках. И если не ради самого фармацевта, то хоть ради собственной безопасности следует призвать общество к безотлагательному решению этого вопроса. Ввиду важности возлагаемых на служащего аптеки обязанностей, строгой ответственности его перед законом, перед обществом и своей собственной совестью, необходимо поставить его в условия, в которых фармацевт всегда мог бы отвечать за свои поступки. Сделать это можно только при установлении 8-часового рабочего дня и обязательного отдыха после дежурства».

Ещё со времён Петра I и Екатерины Великой от фармацевта требовали, чтобы «он был в науках сведущ». Б. Н. Салтыков был убеждён, что и в XX в. общество также было вправе требовать от фармацевта соответствующего усердия в науке, что требовало наличия у фармацевта свободного времени для самосовершенствования, отслеживания специальной литературы и общения с людьми, от которых он мог бы получить новые знания. Достичь этого можно было только при условии уменьшения продолжительности рабочего дня у фармацевта-служащего, так как в существовавших реальных условиях, фармация, по мнению Б. Н. Салтыкова, была низведена до уровня ремесла, а сам фармацевт – до состояния живой машины. Необходимость внедрения перечисленных нововведений диктовалась ещё одним обстоятельством. Известно, что наряду с развитием науки растут и варианты фальсификации, проникающей не только на рынок продуктов, но и на рынок лекарств. Этот процесс во все времена угрожает общественному здоровью, а защитником его может и должен выступать фармацевт, у которого при создавшихся в обсуждаемый период условиях просто не было возможности совершенствоваться в своей профессии.

Б. Н. Салтыков отметил также, что 14-часовая работа оказывала огромное влияние и на нравственную сторону жизни фармацевта. Фармацевты не занимали в обществе, в ряду представителей научно-практических профессий, того места, которое принадлежало им по праву, обусловленному историей и состоянием фармации как науки. Пресса их игнорировала, проявляя определённую тенденциозность. Нередко журналисты, бравшие на себя роль защитников «угнетённых», по ряду причин не справлялись с этой задачей, что приводило к ещё большей дискредитации фармацевтов в глазах читающей публики. Причина подобного отношения общества к представителям фармацевтического сословия крылась, прежде всего, в

том, что из-за своего недосуга фармацевты были обособлены от остального общества, не имели с ним общих интересов и прямой связи, избегали его, терялись в нём и не знали иногда, как себя держать в чуждой им среде. Докладчик эмоционально обратился к слушателям со словами: «Дайте фармацевту свободу, поставьте его в иные жизненные условия, в каких, например, находятся врачи, юристы, художники, учителя, и он станет равноправным представителем интеллигенции». Практическое отсутствие свободных часов у фармацевта в сочетании с постоянным нравственным и физическим утомлением не давало ему возможности посвятить свой краткий досуг научным занятиям или эстетическим развлечениям. В редкие минуты свободы с особой силой проявлялось страстное желание «упиться свободой». И эта жажда бывала порою так сильна, что фармацевты, особенно молодые люди и ученики, предавались ей чрезмерно, позволяя себе излишества, которые влекли за собой поведение, не соответствовавшее научному и общественному положению фармацевта.

Б. Н. Салтыков также обратил внимание коллег на то, что часто условия работы и быта фармацевта практически исключали возможность семейной жизни, так как ему полагались лишь квартира (или койка в общей комнате) и «стол» при аптеке. Фармацевт, не получая ни квартирных, ни столовых денег, на чистое жалование содержать семью не мог или вынужден был с нею бедствовать.

Автор выразил глубокую уверенность в том, что изменение даже некоторых условий работы и быта фармацевтов могло бы привести к существенному улучшению их жизни. Сокращение рабочего дня до 8 часов способно радикально изменить физическое состояние человека, прибавить ему несколько лет жизни, наличие времени на отдых, прогулки, сон – дать возможность лучше выглядеть, увеличить интенсивность труда, иначе относиться к своему делу. Прежняя ненависть к своей специальности и озлобление к окружающим должны были при этом уступить место удовлетворённости, что не могло не отразиться позитивно на работе. Соразмерность труда и сил, затраченных на его выполнение, неизбежно сократило бы риск совершения роковых ошибок, и «общественному здравью», перестала бы угрожать ежеминутная опасность. У фармацевта, имеющего достаточно досуга, появилось бы желание совершенствоваться как в своей специальности, так и в личностном плане. В результате государство приобрело бы интеллигентных работников, деятельность которых была бы направлена на благородное служение интересам «охранения народного здоровья». Общество, в которое войдут фармацевты равноправными членами, встретит в лице последних достойных представителей научно-практической специальности. Сам фармацевт при этом примет все меры к упорядочению слабых сторон своего быта и будет стремиться к удержанию на должной высоте своего профессионального и нравственного достоинства.

Ставя резонный вопрос: «Каким путём может быть проведена в жизнь предложенная реформа?», Б. Н. Салтыков сам отвечал на него: «Только путём обращения к правительственной власти с ходатайством об издании определённых законоположений, долженствующих урегулировать этот вопрос». При этом автор подверг критике половинчатое постановление комиссии, работавшей на III съезде фармацевтов, которая ограничилась лишь «платоническим пожеланием введения системы двух смен и сокращения рабочего времени».

Докладчик пошагово представил предполагаемый план работы по разрешению обозначенной, столь важной для фармацевтического сословия проблемы, заметив при этом, что «для дела безразлично, будет ли это достигнуто путём единогласного соглашения владельцев аптек и всех фармацевтических обществ, авторитету которых подчинится всё сословие, или потребуется вмешательство власти для разрешения проблемы законодательным путём, однако, желательно, чтобы оно прошло при единодушном согласии представителей всего фармацевтического сословия».

Докладчик заметил, что проблема сокращения рабочего дня фармацевтов-служащих может встретить серьёзные возражения со стороны владельцев аптек, примерно такие: «...аптека моя, я вправе предлагать условия работы, какие найду для себя выгодными, и всё предлагаемое есть посягательство на мою собственность». Однако хорошо известно, что снижение нагрузки на рабочего ведёт к увеличению производительности труда и к улучшению самого качества работы. Ярким примером этому мог служить опыт работы харьковских аптекарей Б. Щавинского, И. П. Лапина и М. П. Лапина, которые ввели в принадлежащих им аптеках сокращённый рабочий день, исходя при этом не из гуманных, а из чисто практических соображений. Таким образом, с точки зрения Б. Н. Салтыкова «только рутина и боязнь всякого новшества тормозили осуществление этой благодетельной реформы».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальное изучение содержания доклада Б.Н. Салтыкова ведёт к отчётливому пониманию остроты вопросов, связанных с неудовлетворительными условиями труда и быта фармацевтов-служащих, работавших в аптеках России на рубеже XIX и XX столетий, что было в значительной степени обусловлено 14-часовым рабочим днём. Такие условия труда вели к дискредитации профессии фармацевта и как следствие – к снижению притока в неё свежих, молодых сил. И это происходило в то время, когда во всём мире, равно как и в России, наблюдалось мощное развитие промышленности вообще, также медицины, химии, фармации в частности. В России развивалась земская фармация, организовывались новые аптеки, склады, магазины, продающие медицинские и гигиенические изделия, также частные производства товаров медицинского назначения. Для эффективного функционирования

этих заведений уже требовались новые подходы к организации труда персонала, высокий общеобразовательный и профессиональный уровень сотрудников, заинтересованность в работе. Однако реальное отношение к труду фармацевта в этот период стало серьёзным тормозом развития отечественной фармации.

Несомненно, в изложенном материале прослеживается некоторое упрощение путей решения конкретных задач по улучшению условий труда и быта фармацевтов. Мы убеждены, что нельзя было решить множество проблем, влияющих на жизнь фармацевтического сословия, с помощью лишь сокращения рабочего дня с 14 до 8 часов. Для налаживания нормальной работы и жизни фармацевтов-служащих необходим, как бы сейчас сказали, системный подход. Кроме 8-часовой смены и нормирования дежурств требовались перемены на всех уровнях фармацевтического образования, изменения в законодательной сфере, необходимы были поиск консенсуса между фармацевтами-владельцами и фармацевтами-служащими, соответствующая охрана труда фармацевта и улучшение их быта, и, самое главное, изменения в отношении общества к фармацевту, то есть поднятие престижа этой профессии.

Спустя столетие, пожалуй, можно лишь догадываться, по какой причине такой актуальный, обсто-

ятельный и конкретный доклад не был включён в программу фармацевтического съезда, и следует отдать должное профессионализму, гражданской позиции и мужеству Б. Н. Салтыкова, выступившего с таким сообщением на собрании Высочайше утверждённого Российского Фармацевтического Общества взаимного вспомоществования менее чем через месяц после проигнорировавшего проблему Фармацевтического съезда.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гузев К. С. Незаменимые помощники и партнёры российских естествоиспытателей на рубеже XIX–XX вв. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 3(24): 196–202.
2. Салтыков Б. Н. К вопросу о необходимости сокращения рабочего дня в аптеках. *Фармацевтический вестник*. 1900; 5: 5–97. 1900; 7: 134–136. 1900; 8: 152–154. 1900; 9: 169–172. 1900; 10: 188–191. 1900; 12: 219–221. 1900; 13: 239–241.

## REFERENCES

1. Guzev K. S. Independent assistants and partners of russian natural researchers on the abroad of the XIX–XX century. *Drug development & registration*. 2018; 3(24): 196–202.
2. Saltykov B. N. To the question of the need to reduce working hours in pharmacies. *Pharmaceutical Bulletin*. 1900; 5: 5–97. 1900; 7: 134–136. 1900; 8: 152–154. 1900; 9: 169–172. 1900; 10: 188–191. 1900; 12: 219–221. 1900; 13: 239–241.

## Изучение лекарственного растительного сырья грецкого ореха

Н. В. Чебышев<sup>1</sup>, А. В. Стреляева<sup>1</sup>, Д. И. Лежава<sup>1\*</sup>, А. Н. Луферов<sup>1</sup>, Н. В. Бобкова<sup>1</sup>,  
Н. В. Карташова<sup>1</sup>, Р. М. Кузнецов<sup>1</sup>

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

\*Контактное лицо: Лежава Дианос Иванович. E-mail: dianos1993@mail.ru

Статья получена: 27.03.2019. Статья принята к печати: 05.09.2019

### Резюме

**Введение.** Грецкий орех (*Juglans regia* L.) – лекарственное растение, содержащее большое количество биологически активных веществ. В качестве лекарственного сырья рядом авторов предлагается использовать листья грецкого ореха, в которых идентифицированы юглон, флавоноиды, дубильные вещества, аскорбиновая кислота и другие вещества. В настоящий момент разработана и предложена методика стандартизации данного вида сырья. Однако лекарственное растение грецкий орех может быть источником других видов сырья, таких как плоды грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, коры грецкого ореха, перегородок грецкого ореха. Данные виды лекарственного сырья содержат большое количество биологически активных веществ и обладают большим потенциалом фармакологической активности. Поэтому изучение с последующей стандартизацией лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости и коры грецкого ореха является актуальным.

**Цель.** Целью исследования является изучение внешних признаков, микроскопии сырья коры грецкого ореха и плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости и химического состава спиртового извлечения из данных видов сырья.

**Материалы и методы.** В работе использовались методы хромато-масс-спектрометрии, ТСХ.

**Результаты и обсуждение.** При описании внешних признаков и микроскопии были выявлены диагностические признаки как цельного, так и измельченного сырья, и порошка коры грецкого ореха, плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья коры грецкого ореха, представляет собой прозрачную жидкость бурого цвета. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, представляет собой прозрачную, зелено-бурю жидкость с ароматным запахом.

**Заключение.** Методом ТСХ в коре грецкого ореха идентифицирована галловая кислота. Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости удалось идентифицировать 17 соединений, относящихся к различным классам БАВ. Были идентифицированы сахара, флавоноиды, фенольные соединения кумарины, органические кислоты. В спиртовом извлечении из коры грецкого ореха определены маркерные соединения, совокупность которых делает возможным быструю идентификацию данного вида сырья методом хромато-масс-спектрометрии.

**Ключевые слова:** грецкий орех, кора грецкого ореха, плоды грецкого ореха.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Благодарности.** Поддерживается «Проектом повышения конкурентноспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-исследовательских центров: 5-топ 100» (Сеченовский Университет).

**Вклад авторов.** А. Н. Луферов, Н. В. Бобкова, А. В. Стреляева придумали и разработали эксперимент. Н. В. Карташова и Р. М. Кузнецов провели валидацию методики анализа. Д. И. Лежава, Н. В. Карташова и Р. М. Кузнецов выполнили эксперимент. Д. И. Лежава и Н. В. Карташова участвовали в написании статьи. Все авторы обсудили результаты и внесли свой вклад в окончательную рукопись.

**Для цитирования:** Чебышев Н. В., Стреляева А. В., Лежава Д. И., Луферов А. Н., Бобкова Н. В., Карташова Н. В., Кузнецов Р. М. Изучение лекарственного растительного сырья грецкого ореха. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 38–46.

## Investigation of Walnut Herbal Drug Raw Material

Nikolay V. Chebyshev<sup>1</sup>, Angelina V. Strelyaeva<sup>1</sup>, Dianos I. Lezhava<sup>1\*</sup>, Alexander N. Luferov<sup>1</sup>,  
Natalya V. Bobkova<sup>1</sup>, Natalya V. Kartashova<sup>1</sup>, Roman M. Kuznetsov<sup>1</sup>

1 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Dianos I. Lezhava. E-mail: dianos1993@mail.ru

Received: 27.03.2019. Accepted: 05.09.2019

### Abstract

**Introduction.** Walnut (*Juglans regia* L.) is a medicinal plant containing a large number of biologically active substances. A number of authors propose to use walnut leaves as medicinal raw materials, in which juglone, flavonoids, tannins, ascorbic acid and other substances are identified. Currently, a standardization technique for this type of raw material has been developed and proposed. However, the medicinal plant walnut can be a source of other types of raw materials, such as milky-waxed walnuts, walnut bark, and walnut partitions. These types of medicinal raw materials contain a large number of biologically active substances and have a great potential for pharmacological activity. Therefore, the study with the subsequent standardization of medicinal plant material of walnut fruits in the stage of milky-wax ripeness and walnut bark is relevant.

**Aim.** The aim of the study is to study the external signs, microscopy of raw walnut bark and walnut fruit in the stage of milky-wax ripeness and chemical composition of alcohol extract from these types of raw materials.

**Materials and methods.** Chromato-mass spectrometry and TLC were used in the work.

**Results and discussion.** When describing external signs and microscopy, diagnostic signs of both whole and crushed raw materials, and powder of walnut bark, and fruits of walnut in the stage of milky-wax ripeness were revealed. Alcohol extract obtained from medicinal plant raw materials walnut bark is a clear brown liquid. Alcohol extract obtained from medicinal plant raw materials of walnut fruit at the stage of milky-wax ripeness is a transparent, green-brown liquid with a fragrant odor.

© Чебышев Н. В., Стреляева А. В., Лежава Д. И., Луферов А. Н., Бобкова Н. В., Карташова Н. В., Кузнецов Р. М., 2019

© Chebyshev N. V., Strelyaeva A. V., Lezhava D. I., Luferov A. N., Bobkova N. V., Kartashova N. V., Kuznetsov R. M., 2019

**Conclusion.** Gallic acid was identified by TLC in walnut bark. Chromato-mass spectrometry in alcohol extraction from the fruit of walnut in the stage of milky-wax maturity was able to identify 17 compounds belonging to different classes of biologically active substances. Sugars, flavonoids, coumarin phenolic compounds, organic acids were identified. In alcoholic extraction from the bark of a walnut, marker compounds have been determined, the combination of which makes it possible to quickly identify this type of raw material using chromatography-mass spectrometry.

**Keywords:** walnut, walnut bark, walnut fruit.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Acknowledgements.** Supported by the Russian Academic Excellence Project 5-100 (Sechenov University).

**Contribution of the authors.** Alexander N. Luferov, Natalya V. Bobkova, and Angelina V. Strelyaeva conceived of the presented idea. Angelina V. Strelyaeva developed the theory and performed the computations. Natalya V. Kartashova and Roman M. Kuznetsov verified the analytical methods. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript. Dianos I. Lezhava, Natalya V. Kartashova, and Roman M. Kuznetsov carried out the experiment. Dianos I. Lezhava wrote the manuscript with the support from Natalya V. Kartashova.

**For citation:** Chebyshev N. V., Strelyaeva A. V., Lezhava D. I., Luferov A. N., Bobkova N. V., Kartashova N. V., Kuznetsov R. M. Investigation of walnut herbal drug raw material. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 38–46.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внушительное количество ученых во всем мире занимаются поиском новых природных биологически активных веществ; доскональным изучением фармакологического действия известных биологически активных веществ то есть действия на отдельные системы и на организм в целом; занимаются поиском новых источников получения биологически активных веществ, более выгодных с экономической точки зрения. Этими источниками являются растения. Ученым дан природой широчайший выбор объектов для исследования. Одним из них и является грецкий орех (*Juglans regia* L.), семейство Ореховые (*Juglandaceae*), одно из народных названий которого – царский орех [1, 2].

Многие исследователи упоминали это лекарственное растение в своих научных работах, предварительно проводя множество экспериментов по изучению химического состава – это качественные реакции на основные группы БАВ, метод бумажной хроматографии, метод тонкослойной хроматографии. Проводился количественное определение УФ-спектрофотометрией и высокоэффективной жидкостной хроматографией [6, 15, 16, 18].

Качественными реакциями определен богатый химический состав. В лекарственном растении, присутствуют: хиноны (нафтохинон юглон,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гидроюглоны), флавоноиды (гиперозид, кемпферол), витамин В, аскорбиновая кислота, дубильные вещества, каротиноиды, фенольные кислоты, сиреневый альдегид, юглон (Mateja Colaric, 2005) – и это только в листьях [8–10, 23].

Зеленый околоплодник содержит гидроюглоны и дубильные вещества. В ядрах плодов грецкого ореха идентифицированы жирные масла, белковые вещества, витамины К и Р, аминокислоты [25]. Сырье грецкого ореха широко используется в народной медицине [7]. Ряд исследователей указывает на широкую фармакологическую активность различных видов сырья грецкого ореха. Так по данным ряда авторов (Márcia Carvalho, 2010) грецкий орех обладает выраженным противоопухолевым действием и антипролифера-

тивной активностью [12]. Экстракт из плодов грецкого ореха проявляет высокую противогрибковую, противомикробную и антиоксидантную активность [17, 19–21, 24]. Выявлено противогрибковое действие этанольного экстракта из корней грецкого ореха. Петролеумное извлечение из плодов грецкого ореха показало высокую антигельминтную активность и противопаразитарное действие [4, 13].

Целью исследования является изучение внешних признаков, микроскопии сырья коры грецкого ореха и плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, перегородок грецкого ореха и химического состава спиртового извлечения из данных видов сырья.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили лекарственное растительное сырье плоды грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости и кора грецкого ореха, а также спиртовое извлечение из данного вида сырья. Материалом исследования служили образцы коры и плодов ореха грецкого (*Juglans regia* L.), собранные в Московской области, высушенные воздушно-теньевым способом и используемые в качестве лекарственного растительного сырья.

Плоды заготавливались в июне в стадии молочно-восковой зрелости.

Для выполнения срезов высушенная кора вымачивалась в смеси 95%-й этанол : глицерин : вода (1:1:1). Микроскопия готовилась по методике ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ XIII издания. [22]. Поперечные срезы исследовали с помощью светового микроскопа. (ЛОМО «МИКМЕД-5», Россия) на малом (10х/0,25) и большом (40х/0.65) увеличении.

Фотоснимки выполнялись с использованием цифровой фотокамеры Canon Digital IXUS 80 IS (Китай). Спиртовое извлечение готовили с использованием 96 % спирта по методике получения настойки матричной гомеопатической.

Компонентный состав образцов изучали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Исследование проводили на приборе фирмы Agilent Technologies, состоящем из: 1) газового хроматографа 7890 (колонка HP-5, 50 м × 320 × 1,05 мкм) и 2) масс-селективного детектора 5975 С с квадрупольным масс-анализатором. Температурная программа хроматографирования: при 40 °С – изотерма 2 мин; далее программируемый нагрев до 250 °С со скоростью 5 °С/мин; при 250 °С – изотерма 15 мин; далее программируемый нагрев до 320 °С со скоростью 25 °С/мин; при 320 °С – изотерма 5 мин. Инжектор с делением потока 1:50. Температура инжектора 250 °С. Температура интерфейса 280 °С. Газ носитель – гелий; скорость потока – 1 мл/мин. Хроматограмма образцов – по полному ионному току. Условия масс-спектрометрического анализа: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров в положительных ионах в диапазоне ( $m/z$ ) от 20 до 450 со скоростью 2,5 скан/сек. Программное обеспечение – ChemStation E 02.00. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических линейных индексов удерживания. Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычисляли из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простой нормировки) [14].

Внешние признаки цельного сырья. Кору исследуют невооруженным глазом или с помощью лупы (10х), или стереомикроскопа (8х, 16х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного сырья» [22].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. Свежее сырье представляет собой желобовидные куски коры, длиной 5–6 см, толщиной около 2–3 мм. Наружная поверхность коры гладкая с поперечными морщинками (рисунок 1). Имеются чечевички округлой формы. Внутренняя поверхность коры гладкая. В изломе край волокнистый. Цвет коры снаружи бурый и серовато-бурый, внутри желтовато-телесный. Запах слабый, при смачивании коры водой не усиливается. Вкус горьковатый (рисунок 1).

1.2. Высушенное сырье представляет собой желобовидные куски коры, некоторые свернуты трубочкой, длиной 5–6 см, толщиной около 2–3 мм. Наружная поверхность коры гладкая с поперечными морщинками (рисунок 1). Имеются чечевички округлой формы. Внутренняя поверхность коры гладкая. В изломе край волокнистый. Цвет коры снаружи бурый и серовато-бурый, внутри – желтовато-телесный, светло-коричневый. Запах слабый, при смачивании коры водой не усиливается. Вкус горьковатый.

1.3. Внешние признаки измельченного сырья. Кусочки коры различной формы, преимущественно прямоугольной, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет сырья от светло-коричневого, до темно-красно-коричневого. Возможен темно-се-



**Рисунок 1.** Свежее (А), высушенное (В) цельное сырье, высушенное измельченное сырье (С), порошок коры грецкого ореха (D)

**Figure 1.** Fresh (A), dried (B) whole raw materials, dried ground raw materials (C), walnut bark powder (D)

ро-коричневый цвет. Запах слабый, усиливающийся при намачивании. Вкус горький.

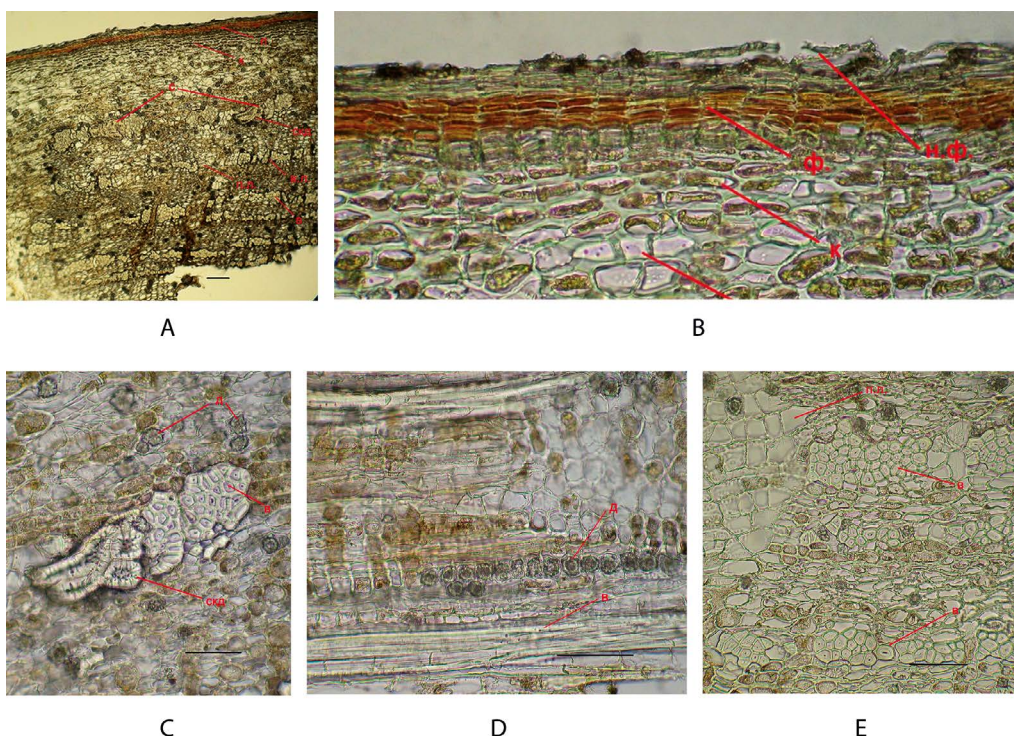
Порошок. Серовато – коричневого цвета, проходящий сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Запах слабый, своеобразный. Вкус горький.

1.4. Перидерма коры, собранной с 2–5-летних веток представлена главным образом многослойной феллемой (пробкой), состоящей из 4–6 слоев тонкостенных, в поперечном сечении таблитчатых клеток, окрашенных в коричневый цвет. Наружные слои пробки состоят из бесцветных омертвевших, чешуйчатых сдвигающихся клеток. Клетки феллодермы, расположенные под пигментированным слоем пробки – не окрашены, сдавлены и деформированы (рисунок 2А).

Под перидермой расположены 3–4 слоя колленхимных клеток, в поперечном сечении слегка тангентально удлинённых, с утолщенными стенками и с зеленовато-аморфным содержимым (рисунок 2В).

Паренхима первичной коры состоит из изодиаметрических полигональных или овальных клеток, стенки которых зачастую пронизаны порами. Некоторые паренхимные клетки содержат друзы оксалата кальция, зеленовато-аморфное содержимое и крахмал. Иногда в паренхиме первичной коры наблюдаются межклеточные полости.

Внутренняя зона первичной коры характеризуется наличием прерывистого «механического пояса», состоящего из групп каменистых клеток (склерейд) и механических волокон, образуя стереом первичной



**Рисунок 2А.** Поперечный срез коры грецкого ореха (масштабная линейка 100 мкм):

в – механические волокна; в.л. – вторичный луч; д – друза оксалата кальция; к – колленхима; н.ф. – наружные слои феллемы; п – перидерма; п.л. – клетки первичного луча; п.п.к. – клетки паренхимы первичной коры; с – стереом первичной коры («механический пояс»); скд – склереида; ф – феллема

**Figure 2A.** Cross-section of walnut bark (scale scale 100 microns):

v – mechanical fibers; v.l. – secondary beam; D – Druse calcium oxalate; k – collenchyme; nf – outer layers of felema; n – periderm; pp – cells of the primary beam; ppt – cells of the parenchyma of the primary cortex; c – stereo of the primary cortex («mechanical belt»); skd – sclereid; f – felema

**Рисунок 2В.** Фрагмент поперечного среза коры, зона перидермы, колленхимы и первичной коры (масштабная линейка 50 мкм):

ф – феллема; н.ф. – наружные слои феллемы; к – колленхима

**Figure 2B.** Fragment of the cross-section of the cortex, periderm zone, collenchyma and primary cortex (scale scale 50 µm):

f – felema; nf – outer layers of felema; k – kollenhima

**Рисунок 2С.** Фрагмент поперечного среза коры, зона стереома первичной коры, участок «механического пояса» (масштабная линейка 50 мкм):

в – механические волокна; д – друза оксалата кальция; скд – склереида

**Figure 2C.** Fragment of the cross-section of the cortex, stereo-primary zone of the cortex, the section of the «mechanical belt» (scale line 50 microns):

v – mechanical fibers; D – Druse calcium oxalate; skd – sklereida

**Рисунок 2Д.** Фрагмент продольно-радиального среза коры, зона вторичной коры (масштабная линейка 50 мкм):

в – механические волокна; д – друза оксалата кальция

**Figure 2D.** Fragment of the longitudinal-radial cut of the cortex, the zone of the secondary cortex (scale bar 50 µm):

v – mechanical fibers; d – druse calcium oxalate

**Рисунок 2Е.** Фрагмент поперечного среза коры, зона вторичной коры (масштабная линейка 50 мкм):

п.л. – клетки первичного луча; в – механические волокна

**Figure 2E.** Fragment of the cross-section of the crust, secondary crust zone (scale bar 50 µm):

p.l. – cells of the primary beam; v – mechanical fibers

коры (рисунок 2А). Волокна узкие, диаметром от 12 до 25 мкм, с очень толстыми стенками, пронизанными немногочисленными простыми порами, с точечной (иногда щелевидной) полостью. Более крупные в диаметре волокна могут встречаться небольшими

группами по 1–3, размер волокон в пучках несколько меньше. Разные по форме склереиды размером от 60 до 90 мкм имеют сильно утолщенные слоистые стенки с многочисленными поровыми каналцами (рисунок 2С).

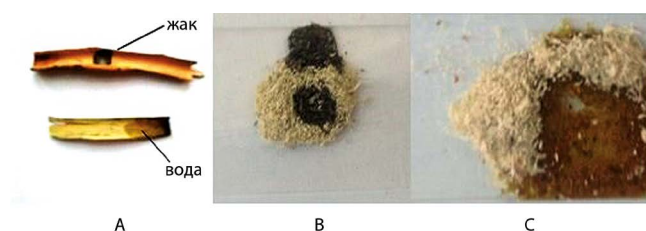
Пучки волокон «механического пояса» – мощные, округлые в очертании, с ними скомплексованы группы каменных клеток, ориентированных тангентально или радиально, что согласуется с данными других авторов (Dayronas Zh.V., 2015) [3, 5]. Данные элементы стереома чередуются с участками клеток коровой паренхимы. В коре более старых веток стереом сформирован в виде сплошного кольца.

Во вторичной коре наблюдается типичная последовательность чередования слоев мягкого луба и пучков механических волокон, формирующих стереом (твёрдый луб) в виде нескольких тангентально ориентированных слоев, которые пронизаны первичными и вторичными сердцевинными лучами (рисунок 2А). Вторичные лучи – однорядные, мелкоклеточные. Клетки первичных лучей крупнее, имеют пористые стенки и формируют многорядные радиально ориентированные участки (рисунок 2Е).

Некоторые клетки мягкого луба содержат друзы оксалата кальция, диаметром от 8 до 27 мкм. На продольно-радиальных срезах видны целые тяжи кристаллоносной паренхимы, сопровождающие пучки механических волокон (рисунок 2D).

Таким образом, с целью стандартизации лекарственного растительного сырья – кора грецкого ореха, были установлены диагностически значимые анатомические признаки. К ним относятся: особенности строения перидермы, стереома первичной и вторичной коры, наличие кристаллических включений (друз оксалата кальция).

1.5. При смачивании внутренней поверхности коры каплей 1 % раствора железоммонийных квасцов наблюдается зеленовато-черное окрашивание (рисунок 3).



**Рисунок 3.** Результаты гистохимической реакции цельной коры грецкого ореха (А) и порошка коры грецкого ореха (В) с 1 % раствором железоммонийных квасцов и результат реакции порошка коры грецкого ореха с 5 % NaOH (С)

**Figure 3.** The results of the histochemical reaction of whole walnut bark (A) and walnut bark powder (B) with a 1 % solution of iron ammonium alum and the result of the reaction of walnut bark powder with 5 % NaOH (C)

Качественные реакции. Измельченную кору в количестве 0,1 г кипятят в течение 2–3 мин с 10 мл воды, охлаждают и фильтруют. К 1 мл фильтрата прибавляют 2–3 капли 1 % раствора железоммониевых квасцов: наблюдается черное окрашивание.

На кору наносят 2–3 капли 5 % раствора гидроксида натрия: наблюдается фиолетово-коричневое окрашивание.

Порошок помещают на предметное стекло и капают 2–3 капли 1 % раствора железоммониевых квасцов: наблюдается синее окрашивание, переходящее в черное (гидролизуемые дубильные вещества).

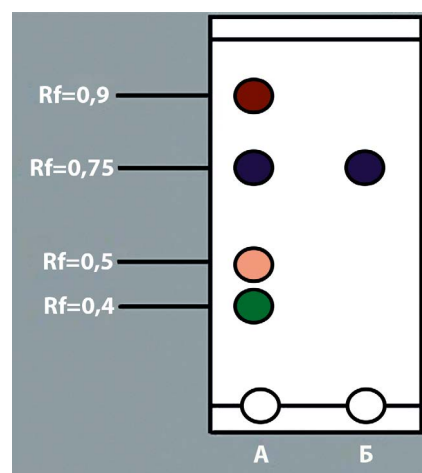
Порошок помещают на предметное стекло и капают 2–3 капли 5 % раствора гидроксида натрия: наблюдается желтое окрашивание, переходящее в красное (фенольные соединения и производные антрахинона).

2. ТСХ – анализ спиртового извлечения коры грецкого ореха.

На линию старта готовой хроматографической пластинки со слоем силикагеля «Сорбфил» наносят раздельно полосами длиной 10 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемой настойки и 5 мкл (0,005 мл) 0,1 % раствора РСО галловой кислоты и хроматографируют восходящим способом в системе растворителей хлороформ : кислота уксусная ледяная : этанол : вода (15:8:3:2) на высоту 10 см. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе до удаления следов растворителей и рассматривают в УФ – свете при длине волны 365 нм.

В УФ – свете при длине волны 365 нм на хроматограмме 0,1 % раствора РСО галловой кислоты должна обнаруживаться зона коричневого цвета с Rf около 0,75.

В УФ – свете при длине волны 365 нм на хроматограмме должны обнаруживаться зоны коричневого цвета с Rf около 0,5; 0,9; дополнительно могут быть обнаружены зоны: коричневого цвета с Rf около 0,4 (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Хроматограмма спиртового извлечения из коры грецкого ореха на обнаружение галловой кислоты:

А – извлечение из коры грецкого ореха; Б – государственный стандартный образец галловой кислоты)

**Figure 4.** Chromatogram of alcohol extraction from walnut bark for detection of gallic acid:

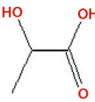
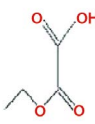
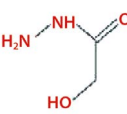
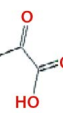
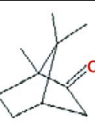
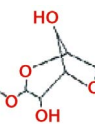
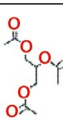
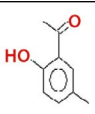
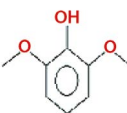
А – extraction of walnut bark; Б – state standard sample of gallic acid

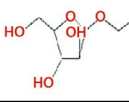
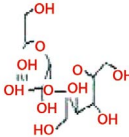
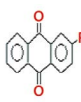
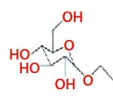
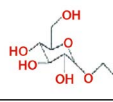
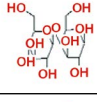
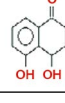
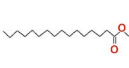
В извлечении из коры грецкого ореха методом ТСХ были обнаружены дубильные вещества – галловая кислота.

Методом хромато-масс-спектрометрии было проанализировано спиртовое извлечение, полученное из коры грецкого ореха. Было идентифицировано 20 соединений, относящихся к разным классам: спиртам, кислотам, сахарам, кетонам, антраценпроизводным, терпенам, эфирам и прочим соединениям (таблица 1).

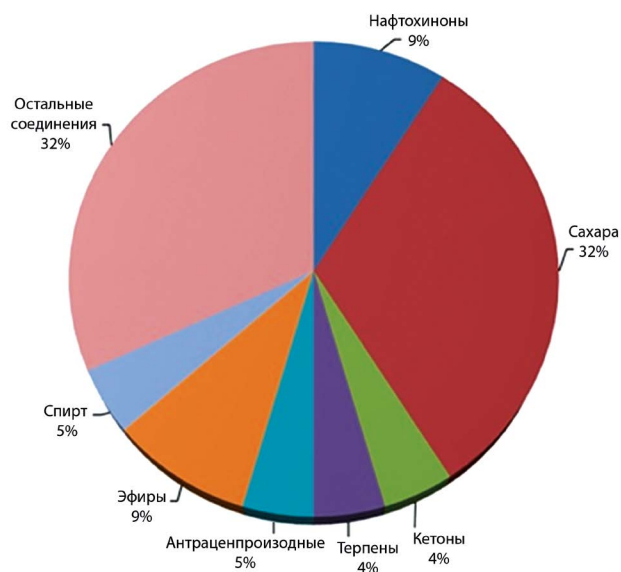
**Таблица 1. Основные соединения, идентифицированные в спиртовом извлечении из коры грецкого ореха**

**Table 1. The main compounds identified in alcohol extraction from the walnut bark**

| №  | Наименование                    | Формула                                                                             | Rt, мин | %    | Основные пики                               |
|----|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|------|---------------------------------------------|
| 1  | 2-гидроксипропановая кислота    |    | 19,18   | 1,84 | 45, 28, 29, 27, 43, 26, 74, 44, 56, 42      |
| 2  | Цинеол                          |    | 27,75   | 0,9  | 43, 81, 71, 108, 111, 41, 69, 84, 93, 55    |
| 3  | Этил гидроген оксалат           |   | 29,38   | 0,08 | 44, 28, 31, 29, 27, 45, 74, 43, 26, 32      |
| 4  | 1,2-гидрокси-ацетогидразин      |  | 29,47   | 0,7  | 31, 32, 29, 28, 30, 44, 90, 62, 43, 42      |
| 5  | Туйон                           |  | 30,35   | 0,4  | 81, 41, 68, 110, 67, 69, 109, 95, 39, 55    |
| 6  | 2-оксипропановая кислота        |  | 30,96   | 1,03 | 43, 15, 44, 45, 42, 28, 29, 14, 18, 39      |
| 7  | Камфора                         |  | 31,93   | 9,63 | 95, 81, 69, 55, 108, 83, 67, 109, 68, 152   |
| 8  | Маннопиранозид                  |  | 34,56   | 0,34 | 43, 44, 29, 57, 41, 27, 31, 28, 55, 42      |
| 9  | Триацетин                       |  | 36,68   | 0,81 | 43, 103, 145, 116, 15, 115, 86, 44, 42, 73  |
| 10 | О-ацетил – п-крезол             |  | 36,90   | 0,47 | 135, 150, 77, 107, 43, 136, 51, 39, 53, 151 |
| 11 | 1,3-диэтиловый эфир пирогаллола |  | 37,80   | 2,01 | 154, 139, 111, 93, 96, 65, 39, 51, 155, 68  |

| №  | Наименование                                | Формула                                                                               | Rt, мин | %     | Основные пики                                  |
|----|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|------------------------------------------------|
| 12 | Этил-α-d-рибозид                            |    | 38,657  | 2,03  | 60, 73, 47, 43, 75, 57, 74, 42, 45, 44         |
| 13 | Сахароза                                    |    | 39,85   | 25,27 | 73, 57, 31, 43, 60, 61, 44, 71, 86, 45         |
| 14 | 1,6-ангидро-α-d-талопиранозид               |    | 41,38   | 4,23  | 60, 73, 57, 43, 42, 56, 55, 47, 71, 70         |
| 15 | 2-бензамид-оантрахинон                      |    | 44,58   | 0,26  | 207, 105, 133, 151, 134, 132, 104, 77, 106, 18 |
| 16 | Этил-α-D-глюкопиранозил                     |    | 45,02   | 1,54  | 60, 42, 43, 73, 57, 47, 75, 45, 74, 71         |
| 17 | Этил-α-D-глюкопиранозил                     |    | 45,16   | 29,75 | 60, 42, 43, 73, 57, 47, 75, 45, 74, 71         |
| 18 | Лактоза                                     |   | 45,67   | 4,86  | 73, 43, 60, 31, 61, 57, 85, 71, 29, 103        |
| 19 | 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон |  | 47,14   | 3,71  | 88, 101, 55, 41, 89, 43, 27, 57, 73, 70        |
| 20 | Этиловый эфир пальмитиновой кислоты         |  | 56,42   | 4,61  | 160, 131, 132, 121, 39, 104, 77, 66, 64, 103   |

Было подсчитано относительное процентное содержание каждого компонента с учетом неидентифицированных пиков (диаграмма 1).



**Диаграмма 1**

Максимальное содержание приходится на сахара, а именно на сахарозу 25,27 %, на Этил- $\alpha$ -D-глюкопиранозил 29,75 %, и на лактозу 4,86 %.

Идентифицированы терпеновые соединения, общее содержание которых приходится практически на 2 место. Содержание камфоры – 9,63 %, содержание цинеола – 0,9 %, содержание туйона – 0,4 % (Диаграмма 1). Идентифицированы маркерные соединения производные юглона 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон и производное антрацена 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон. С данными соединениями связывают фармакологическую активность лекарственного растительного сырья.

В задачу исследований входило изучение сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости. Микроскопию плода готовили по общепринятой методике [4, 22]. Следует отметить наиболее важные диагностические признаки плодов: эпидермальные клетки «окончатого» строения; расположенные группами крупные овальные устьица аномоцитного типа; волоски простые, одноклеточные, толстостенные, соединенные по 2–4 в основании редко; волоски головчатые с 1–3- или многоклеточной однорядной ножкой и многоклеточной железистой головкой (редко) и округлые окрашенные места прикрепления простых и железистых волосков [4, 22].

При исследовании поперечного среза околоплодника видны: экзокарпий, состоящий из однослойного мелкоклеточного эпидермиса, покрытого слоем желтоватой кутикулы, трех-четырёхслойной колленхимы, подстилающей эпидермис, и почти непрерывного, неравномерного по толщине механического пояса, состоящего из толстостенных каменных клеток различной формы, пронизанных порами; мезокарпий, состоящий из крупных тонкостенных паренхимных клеток с зеленоватым зернистым содержанием, друзами оксалата кальция; в толще паренхимы беспорядочно разбросаны проводящие пучки, сосуды и трахеиды которых имеют преимущественно спиральную и лестничную утолщенность клеточных стенок (давленный препарат мезокарпия), а также каменные клетки с пористыми слоистыми, не очень толстыми стенками; эндокарпий (скорлупа), наружная часть которого (примыкающая к мезокарпию) состоит из склерифицированных пористостенных клеток, а внутренняя (примыкающая к семени) – из тонкостенных округлых паренхимных клеток. При исследовании микропрепарата семенной кожуры с поверхности видны: полигональные коричневатые клетки эпидермиса; очень крупные устьица с зияющей устьичной щелью и почковидными замыкающими клетками; под эпидермисом – проводящие пучки клетки паренхимы с каплями жирного масла. При исследовании микропрепарата поперечного среза семядолей (зародыша семени) видны: мелкие тонкостенные паренхимные клетки с зернистым содержанием; капли жирного масла в незрелом ядре встречаются редко [4, 22, 23, 26].

Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, представляет собой прозрачную, зелено-бурюю жидкость с ароматным запахом. Методом хромато-масс-спектрометрии спиртового извлечения из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости удалось идентифицировать 17 соединений, относящихся к различным классам БАВ. Были идентифицированы сахара, флавоноиды, фенольные соединения и кумарины, юглон, органические кислоты.

Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из перегородок грецкого ореха было идентифицировано 7 соединений, относящихся к производным нафтохинона, антрацена, и ситостерина (таблица 2)

**Таблица 2. Основные соединения, идентифицированные в спиртовом извлечении из перегородок грецкого ореха**

**Table 2. The main compounds identified in alcohol extraction from walnut partitions**

| № | Соединение                                                          | Структурная формула | RT, мин | Area   | Area, % |
|---|---------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|--------|---------|
| 1 | Цис-6-терпинеол                                                     |                     | 14,618  | 21484  | 1,8     |
| 2 | Туйон                                                               |                     | 15,800  | 27567  | 2,3     |
| 3 | Транс-пинан                                                         |                     | 17,617  | 59772  | 4,9     |
| 4 | 6-этил-2,3,5,7-тетрагидрокси-1,4-нафтохинон                         |                     | 20,545  | 1342   | 0,1     |
| 5 | 7-изопропил-4а,8а-диметил-4а,5,6,7,8,8а-гексагидро-2(1H)-нафталенон |                     | 21,442  | 10283  | 0,8     |
| 6 | 9-этил-9,10-диметил-9,10-дигидроантрацен                            |                     | 23,877  | 4276   | 0,4     |
| 7 | Ситостерол                                                          |                     | 26,170  | 610477 | 50,2    |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При описании внешних признаков и микроскопии были выявлены диагностические признаки как цельного, так и измельченного сырья, и порошка коры грецкого ореха, а также его плодов в стадии молочно-восковой зрелости.
2. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья кора грецкого ореха представляет собой прозрачную жидкость буро-

го цвета. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, представляет собой прозрачную, зелено-бурую жидкость с ароматным запахом. Методом ТСХ в коре грецкого ореха идентифицирована галловая кислота.

3. Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости удалось идентифицировать 17 соединений, относящихся к различным классам БАВ. Были идентифицированы сахара, флавоноиды, фенольные соединения кумарины, органические кислоты. В спиртовом извлечении из коры грецкого ореха определены маркерные соединения, совокупность которых делает возможным быструю идентификацию данного вида сырья методом хромато-масс-спектрометрии. Маркерные соединения производные юглона 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон и производное антрацена 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон. С данными соединениями связывают фармакологическую активность лекарственного растительного сырья.
4. Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из перегородок грецкого ореха было идентифицировано 7 соединений, в том числе, производные нафтохинонов и антрацена.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андриенко М. В., Затоковский Ф. Т. Грецкий орех в Приднестровье Садоводство и Виноградарство. М.: Медицина. 1989: 328.
2. Атлас лекарственных растений СССР. М.: ГИМЛ, 1962: 404.
3. Дайронас Ж. В., Пшукова И. В. Изучение состава липофильной фракции листьев ореха грецкого, произрастающего на Кавказских Минеральных Водах. *Химия растительного сырья*. 2010; 4: 91–93.
4. Щеглова Т. А., Курилов Д. В., Стреляева А. В. Изучение химического состава и антиоксидантной активности настойки матричной гомеопатической листьев шалфея лекарственного. *Фармация*. 2012; 3: 27–30.
5. Solar A., Colaric M., Usenik V., Stampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 2006; 106: 453–461. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.09.012.
6. Fernández-Agulló A., Pereira E., Freire M. S., Valentão P., Andrade P. B., González-Álvarez J., Pereira J. A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013; 42: 126–132. Doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021.
7. Залыгина Е. В., Кошечкина И. П., Подплетная Е. А. Противомикробная активность густого водно-спиртового экстракта незрелых плодов ореха грецкого. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe*. 2017; 1-1(17): 127–134.
8. Залыгина Е. В., Подплетная Е. А. Исследование противоязвенной активности густого экстракта незрелых плодов грецкого ореха на модели диклофенак-индуцированной язвы желудка крыс. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017; 10(3): 324–328.
9. Верниковский В. В., Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н., Хаджиева З. Д. Экстракция биологически активных веществ из сырья ореха грецкого: Современные подходы. *Фармация*. 2019; 1: 5–9. Doi: 10.29296/25419218-2019-01-01.
10. Carvalho M., Ferreira P. J., Mendes V. S., Silva R., Pereira J. A., Jerónimo C., Silva B. M. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 441–447. Doi: 10.1016/j.fct.2009.10.043.
11. Raja V., Ahmad, S. I., Irshad M., Wani W. A., Siddiqi W. A., Shreaz S. Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017; 27(4): 476–486. Doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.002.
12. Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Железникова А. С., Помогайбин А. В. Морфолого-анатомическое исследование рахисов и черешков листа ореха грецкого (*Juglans regia* L.) *Фундаментальные исследования*. 2014; 5-1: 102–108.
13. Dev T. N., Apraj V., Bhagwat A., Mallya R., Sawant L., Pandita N. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. Bark. *Pharmacognosy Journal*. 2011; 3(25): 39–43. Doi: 10.5530/pj.2011.25.7.
14. Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P. B., Ferreira I.C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 2287–2295. Doi: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
15. Labuckas D. O., Maestri D. M., Perello M., Martinez M. L., Lamarque A. L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*. 2008; 107: 607–612. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.051.
16. Abdallah I. B., Tlili N., Martinez-Force E., Gracia Pérez Rubio A., Perez-Camino M. C., Albouchi A., Boukhina S. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry*. 2015; 173: 972–978. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.095.
17. Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L., Pereira J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2326–2331. Doi: 10.1016/j.fct.2008.03.017.
18. Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnuts (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2103–2111. Doi: 10.1016/j.fct.2008.02.002.
19. Colaric M., Veberic R., Solar A., Hudina M., Stampar F. Phenolic Acids, Syringaldehyde, and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia* L. J. Agric. *Food Chemistry*. 2005; 53: 6390–6396. Doi: 10.1021/jf050721n.
20. Горлов И. Ф., Юрина И. С. и др. Заявка № 2000128372/13(030034) на патент на изобр.: Способ получения экстракта грецких орехов молочно-восковой спелости в авиационном керосине, 13.11.2000.
21. Самылина И. А., Стреляева А. В., Лазарева Н. Б., Садыков В. М. Гомеопатические препараты из фармакопейного лекарственного растительного сырья: Учебное пособие. М.: ООО Издательство «Медицинское информационное агентство», 2012: 432.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. 2015. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1.html/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1.html/HTML/)
23. Самылина И. А., Ермакова В. А., Бобкова Н. В., Аносова О. Г. Лекарственное растительное сырье, сборы. Растительные порошки. Лекарственные средства на основе измельченного сырья. Фармакогнозия атлас. Том 3. Издательская группа «ГЭОТАР – Медиа». 2009: 448.
24. Орлова О. Ю., Насонова Ю. К. Использование грецкого ореха молочно-восковой спелости для разработки функциональных продуктов питания. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств*. 2014; 2: 20.
25. Ермакова В. А., Бобкова Н. В., Самылина И. А. Микроскопическое исследование незрелых плодов грецкого ореха. «Традиционная медицина – 2007» Сборник научных трудов конгресса. М.: изд-во «Федерального научного клинико-экспериментального центра традиционных методов диагностики и лечения Росздрава – 2007». 2007: 43–47.
26. Дайронас Ж. В. Морфолого-анатомическое изучение коры ореха грецкого (*Juglans Regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 1-2: 234.

## REFERENCES

- Andrienko M. V., Zatokovsky F. T. Walnut in Transdnistria Sadovodstvo and Vinogradarstvo. M.: *Meditisina*. 1989: 328 (in Russ.).
- Atlas of Medicinal Plants of the USSR. M.: *GUGK*. 1962: 404 (in Russ.).
- Dayronas Zh. V., Pshukova I. V. Study of the composition of the lipophilic fraction of walnut leaves growing in the Caucasian Mineral Waters Chemistry of plant raw materials. *Chemistry of plant raw materials*. 2010. 4: 91–93 (in Russ.).
- Shcheglova T. A., Kurilov D. V., Strelyaeva A. V. The chemical composition and antioxidant activity of mother tincture from the leaves of *Salvia officinalis*. *Pharmacy*. 2012; 3: 27–30 (in Russ.).
- Solar A., Colaric M., Usenik V., Stampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 2006; 106: 453–461. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.09.012.
- Fernández-Agulló A., Pereira E., Freire M. S., Valentão P., Andrade P. B., González-Álvarez J., Pereira J. A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013; 42: 126–132. Doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021.
- Zalygina E. V., Koshevaya I. P., Podpletynaya E. A. Antimicrobial activity of a thick aqueous-alcoholic extract of unripe walnut fruit. *Czasopismo Naukowe*. 2017; 1-1(17): 127–134 (in Russ.).
- Zalygina E. V., Podpletynaya E. A. Investigation of the antiulcer activity of a thick extract of unripe walnut fruit on a model of diclofenac-induced gastric ulcer of rats. *Topical issues in pharmaceutical and medical science and practice*. 2017; 10(3): 324–328. (in Ukraine).
- Vernikovskiy V. V., Dayronas Zh. V., Zilfikarov I. N., Khadzhieva Z. D. Extraction of biologically active substances from raw walnut raw materials: Modern approaches. *Pharmacy*. 2019; 1: 5–9 (in Russ.).
- Carvalho M., Ferreira P. J., Mendes V. S., Silva R., Pereira J. A., Jerónimo C., Silva B. M. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 441–447. Doi: 10.1016/j.fct.2009.10.043.
- Raja V., Ahmad, S. I., Irshad M., Wani W. A., Siddiqi W. A., Shreaz S. Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017; 27(4): 476–486. Doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.002.
- Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Zheleznikova A. S., Pomogaybin A. V. Morphological-anatomical study of rachises and stalks of walnut leaf (*Juglans regia* L.) *Basic research*. 2014; 5-1: 102–108 (in Russ.).
- Dev T. N., Apraj V., Bhagwat A., Mallya R., Sawant L., Pandita N. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. Bark. *Pharmacognosy Journal*. 2011; 3(25): 39–43. Doi: 10.5530/pj.2011.25.7.
- Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P. B., Ferreira I.C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 2287–2295. Doi: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
- Labuckas D. O., Maestri D. M., Perello M., Martinez M. L., Lamarque A. L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*. 2008; 107: 607–612. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.051.
- Abdallah I. B., Tlili N., Martinez-Force E., Gracia Pérez Rubio A., Perez-Camino M. C., Albouchi A., Boukhcina S. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry*. 2015; 173: 972–978. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.095.
- Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L., Pereira J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2326–2331. Doi: 10.1016/j.fct.2008.03.017.
- Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnuts (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2103–2111. Doi: 10.1016/j.fct.2008.02.002.
- Colaric M., Veberic R., Solar A., Hudina M., Stampar F. Phenolic Acids, Syringaldehyde, and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia* L. *J. Agric. Food Chemistry*. 2005; 53: 6390–6396. Doi: 10.1021/jf050721n.
- Gorlov I. F., Yurina I. S. et al. Application № 2000128372/13(030034) for a patent for an image: A method for obtaining an extract of walnuts of milky wax ripeness in aviation kerosene, 13.11.2000 (in Russ.).
- Samylina I. A., Strelyaeva A. V., Lazareva N. B., Sadykov V. M. Homeopathic preparations from pharmacopeial medicinal plant raw materials: Textbook. M.: *Publishing House «Medical Information Agency»*. 2012: 432 (in Russ.).
- Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. 2015. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1\\_html/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1_html/HTML/) (in Russ.).
- Samylina I. A., Ermakova V. A., Bobkova N. V., Anosova O. G. Pharmacognosy atlas. Volume 3. *Publishing group «GEOTAR – Media»*. 2009: 488 (in Russ.).
- Orlova, O. Yu., Nasonova, Yu. K. The use of milky-wax ripeness for the development of functional foods. *Scientific journal NRU ITMO. Series: Processes and Food Production Equipment*. 2014; 2: 20 (in Russ.).
- Ermakova V. A., Bobkova N. V., Samylina I. A. Microscopic examination of immature walnut fruit. «Traditional Medicine – 2007» Collection of scientific papers of the congress M.: *Publishing house of the «Federal Scientific Clinical and Experimental Center for Traditional Diagnostic and Treatment Methods of Roszdrav – 2007»*. 2007: 43–47 (in Russ.).
- Dayronas Zh. V. Morphological and anatomical study of walnut (*Juglans regia* L.), gray walnut (*Juglans cinerea* L.) and walnut black (*Juglans nigra* L.) *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 1-2: 234 (in Russ.).

26-я Международная специализированная выставка

# аптека



2-5 декабря 2019

Москва, ЦВК «Экспоцентр»



**151**

Компания-  
участник



**5090**

Профессиональных  
посетителей



**43**

Региона  
России



**38**

Стран  
мира

## УЧАСТИЕ СО СТЕНДОМ. ПОЧЕМУ ЭТО ВАЖНО

- Расширьте географию контактов со специалистами отрасли
- Презентуйте ваши новинки, технологии и инновации
- Участвуйте в деловой программе в качестве эксперта
- Получите специальную маркетинговую поддержку участника выставки
- Демонстрируйте стабильность вашего бизнеса
- Встречайтесь с партнерами и клиентами на удобной профессиональной площадке

## РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

- ♦ Лекарства
- ♦ Нутрицевтика и диетология
- ♦ Косметология и гигиена
- ♦ Медицинский и сестринский уход
- ♦ Инновации для здоровья
- ♦ Цифровизация бизнеса
- ♦ Услуги и партнёрства
- ♦ Лаборатории
-  Традиционные медицинские системы мира

главное событие  
российского  
аптечного рынка

Организатор

МОСКВА РОССИЯ

ЕВРОЭКСПО



VIENNA AUSTRIA

EUROEXPO

Exhibitions and Congress Development GmbH

+7 (495) 925-65-61/62

[www.aptekaexpo.ru](http://www.aptekaexpo.ru)

Оригинальная статья/Research article

## Сравнительная характеристика определения антиоксидантной активности плодов облепихи крушиновидной различными методами

О. В. Тринева<sup>1\*</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

\*Контактное лицо: Тринева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

Статья получена: 28.08.2019. Статья принята к печати: 13.11.2019

### Резюме

**Введение.** В последнее время первичной оценке фармакологического эффекта различных препаратов с использованием тестов *in vivo* и *in vitro* в литературе уделяется большое внимание. Известно, что такое лекарственное растение, как облепиха крушиновидная, по своему фитохимическому составу богата природными антиоксидантами: каротиноиды, токоферолы, флавоноиды, аскорбиновая кислота и др. В отдельных публикациях имеются сведения об антиоксидантной активности плодов облепихи крушиновидной и жирного масла на их основе. Однако, информации о сравнительной характеристике применения различных методов для определения антиоксидантной активности данного вида лекарственного растительного сырья и полученных результатов, в научной литературе не обнаружено.

**Цель.** Целью настоящей работы являлось сравнительное определение антиоксидантной активности лекарственного растительного сырья плодов облепихи крушиновидной различными методами.

**Материалы и методы.** Определена суммарная антиоксидантная активность водных и водно-спиртовых извлечений из плодов облепихи крушиновидной с использованием различных методик, рекомендуемых в литературе. Антиоксидантную активность извлечений определяли методом перманганатометрического титрования, методом ингибирования аутоокисления адреналина *in vitro*, а также на биологической модели – культуре клеток *Parametium caudatum*.

**Результаты и обсуждение.** Исследовано влияние полярности экстрагента на величину антиоксидантной активности. Установлено, что наибольшее содержание антиоксидантов в извлечении наблюдается при использовании 96 % этанола в качестве экстрагента.

**Заключение.** При помощи трех методов показана перспективность использования плодов облепихи крушиновидной и препаратов на их основе в качестве источника антиоксидантов.

**Ключевые слова:** облепиха крушиновидная, антиоксидантная активность.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Автор осуществлял заготовку образцов. Автором проведены исследования антиоксидантной активности извлечений из плодов облепихи крушиновидной методами перманганатометрического титрования, прямой спектрофотометрии и на модели живой клетки – *Parametium caudatum*. Автором произведены теоретические расчеты и статистическая обработка результатов эксперимента. Автор написал текст статьи, в том числе и обсуждение результатов, а также построил все рисунки и графики, отражающие основные результаты работы.

**Для цитирования:** Тринева О. В. Сравнительная характеристика определения антиоксидантной активности плодов облепихи крушиновидной различными методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 48–52.

## Comparative Characteristics of Determination of Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Fruits by Various Methods

Olga V. Trineeva<sup>1\*</sup>

1 – Voronezh State University, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

\*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

Received: 28.08.2019. Accepted: 13.11.2019

### Abstract

**Introduction.** Recently, much attention has been paid to the primary assessment of the pharmacological effect of various drugs using *in vivo* and *in vitro* tests. It is known that such a medicinal plant as sea buckthorn, in its phytochemical composition is rich in natural antioxidants: carotenoids, tocopherols, flavonoids, ascorbic acid, etc. In some publications there is information about the antioxidant activity of sea buckthorn and fatty oil based on them. However, information on the comparative characteristics of the use of various methods for determining the antioxidant activity of this type of medicinal plant material and the results obtained are not found in the scientific literature.

**Aim.** The aim of this work was a comparative determination of the antioxidant activity of medicinal plant material of buckthorn fruits of various species of buckthorn.

**Materials and methods.** The total antioxidant activity of water and water-alcohol extracts from the fruits of sea buckthorn fruits was determined using various techniques recommended in the literature. The antioxidant activity of the extracts was determined by permanganometric titration, *in vitro* inhibition of adrenaline autooxidation, and also in a biological model, *Parametium caudatum* cell culture.

**Results and discussion.** The effect of the extractant polarity on the value of antioxidant activity was studied. It was found that the highest content of antioxidants in the extraction is observed when using 96 % ethanol as an extractant.

**Conclusion.** Using three methods, the prospects of using sea buckthorn fruits and preparations based on them as a source of antioxidants are shown.

**Keywords:** Sea buckthorn, antioxidant activity.

© Тринева О. В., 2019

© Trineeva O. V., 2019

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** The author procured samples. The author studies the antioxidant activity of extracts from sea buckthorn fruits by methods of permanganatometric titration, direct spectrophotometry and on a living cell model – *Paramecium caudatum*. The author made theoretical calculations and statistical processing of the experimental results. The author wrote the text of the article, including a discussion of the results, and also built all the drawings and graphs that reflect the main results of the work.

**For citation:** Trineeva O. V. Comparative characteristics of determination of antioxidant activity of sea buckthorn fruits by various methods. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 48–52.

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее время первичной оценке фармакологического эффекта различных препаратов с использованием тестов *in vivo* и *in vitro* в литературе уделяется большое внимание. Большой интерес к определению антиоксидантной активности (АОА) лекарственных препаратов, в том числе фитопрепаратов, лекарственного растительного сырья (ЛРС) и входящих в их состав биологически активных веществ (БАВ). Основные природные антиоксиданты (АО) – это витамины Е и С, каротиноиды, флавоноиды, ароматические оксикислоты, антоцианы и др. Особую значимость представляют биофлавоноиды, обладающие антиканцерогенными, антисклеротическими, противовоспалительными и антиаллергическими свойствами. Биофлавоноиды по антиоксидантной активности в десятки раз превосходят витамины С и Е. Известно, что такое широко известное лекарственное растение, как облепиха крушиновидная, по своему фитохимическому составу богата природными АО: токоферолы, флавоноиды, каротиноиды, аскорбиновая кислота и др. [1, 2]. В отдельных публикациях имеются сведения об АОА плодов облепихи крушиновидной и жирного масла на их основе [3, 4]. Однако, информации о сравнительной характеристике применения различных методов для определения АОА данного вида ЛРС и полученных результатов, в научной литературе не обнаружено.

Целью настоящей работы являлось сравнительное определение антиоксидантной активности лекарственного растительного сырья облепихи крушиновидной различными методами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырьем служили собранные на территории Воронежской области в период полного созревания плоды дикорастущего кустарника облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) из сем. лоховых (*Elaeagnaceae*). Извлечения готовили путем нагревания ЛРС с экстрагентом в соотношении 1,5:100 на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 минут. Полученные извлечения декантировали с остатка сырья и фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата. Для оценки влияния полярности экстрагента на АОА получаемого извлечения, использовали воду, 40 %, 70 % и 96 % этиловый спирт. Полученные извлечения представляет собой сложную смесь биологически активных веществ, а так-

же сопутствующих компонентов, извлекаемых из сырья в ходе экстракции.

По данным литературы, самыми широко используемыми методами для определения АОА являются спектральные, самыми простыми и доступными – титриметрические, а наиболее близкими к оценке действия на макроорганизм – биологические [5–15], что обусловило выбор методов ведения эксперимента. АОА, во-первых, определяли титриметрически по методике, разработанной Т. В. Максимовой с соавторами [16]. В качестве растворов сравнения использовали такие известные АО, как кверцетин и рутин. Суммарную АОА (мг/г), соответствующую содержанию БАВ восстанавливающего характера в пересчете на указанные АО, рассчитывали по известной формуле [16].

АОА извлечений, во-вторых, изучали по их способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода [17]. Анализ проводили по известной методике, выражая результат в процентах ингибирования аутоокисления адреналина. Величина АОА > 10 % свидетельствует о наличии АОА.

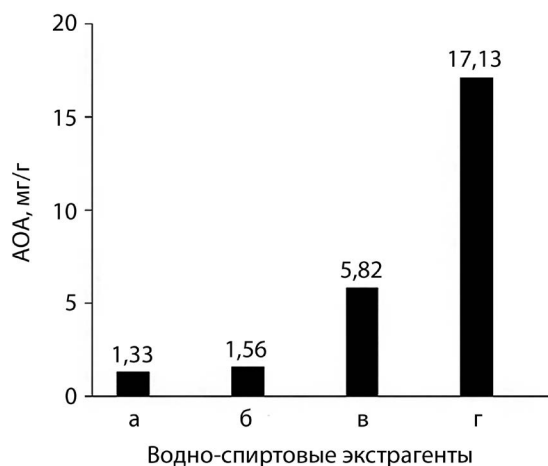
Культура клеток *Paramecium caudatum* была также использована в качестве биологической модели для определения антиоксидантного (регулирующего перекисное окисление липидов) действия водных извлечений из изучаемого ЛРС [18]. Извлечения готовили по типу отваров в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ «Настои и отвары» [19, 20]. Из нескольких существующих методик нами был выбран «Метод разрешающего воздействия» с использованием культуры инфузорий *Paramecium caudatum*. Определение проводили по известной методике [18]. В качестве разрешающего фактора использовали 3 % раствор водорода пероксида, вызывающего 100%-ую гибель клеток в течение 5 минут. В работе использовали культуру инфузорий, содержащую в экспоненциальной фазе не менее 2500–3000 особей в мл среды, а в стационарной не менее 6500–7500 особей [18].

Статистическую обработку результатов проводили по ОФС ГФ РФ XIV изд. «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения АОА водных и водно-спиртовых извлечений из плодов облепихи крушиновидной по методике перманганатометрического тит-

рования представлены на рисунке 1. Установлено, что наибольшей АОА обладают извлечения, полученные с применением 96 % этанола. Результаты статистической обработки экспериментально полученных данных приведены в таблице 1.



**Рисунок 1.** Значение показателя АОА извлечения из свежих плодов облепихи, полученных с использованием различных экстрагентов: а – вода; б – 40 % этанол; в – 70 % этанол; г – 96 % этанол (в пересчете на кверцетин, мг/г)

**Figure 1.** The value of the AOA indicator of extraction from fresh fruits of sea buckthorn obtained using various extractants: а – water; б – 40 % ethanol; в – 70 % ethanol; г – 96 % ethanol (in terms of quercetin, mg/g)

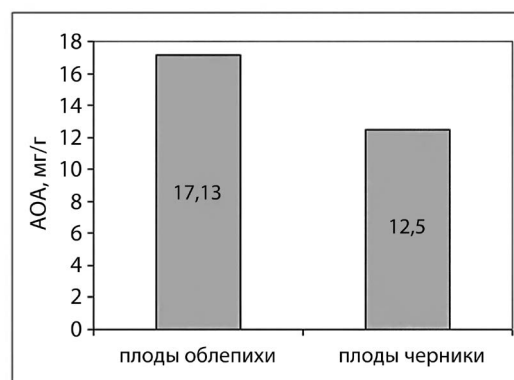
**Таблица 1.** Метрологическая характеристика метода анализа (P = 95 %; n = 5)

**Table 1.** Metrological characteristics of the analysis method (P = 95 %; n = 5)

| f | $x_{cp}$ | $S^2$   | S     | $Sx_{cp}$ | $t(P, t)$ | $\Delta x$ | $\Delta x_{cp}$ | $\varepsilon, \%$ | $\varepsilon_{cp}, \%$ |
|---|----------|---------|-------|-----------|-----------|------------|-----------------|-------------------|------------------------|
| 4 | 17,13    | 0,00212 | 0,104 | 0,046     | 2,78      | 0,289      | 0,1302          | 1,69              | 0,76                   |

На рисунке 2 представлено сравнение результатов собственных исследований по определению АОА плодов облепихи крушиновидной с литературными данными по АОА плодов черники, определённой по аналогичной методике [9]. Полученные данные указывают на достаточно высокое содержание АО флавоноидной структуры и свидетельствуют о перспективности использования плодов облепихи и лекарственных препаратов на её основе в качестве антиоксидантных средств.

Несомненными достоинствами метода являются простота выполнения, экспрессность, доступность, малая ошибка определения и минимальная стоимость одного анализа, так как отсутствует необходимость использования специального дорогостоящего оборудования. Недостатком данной методики, основанной на окислении веществ-антиоксидантов перманганатом калия в кислой среде, является то, что способ позволяет определить только суммарное количественное содержание всех веществ, обладающих АОА в пересчете чаще всего на рутин, кверцетин, галловую и аскорби-

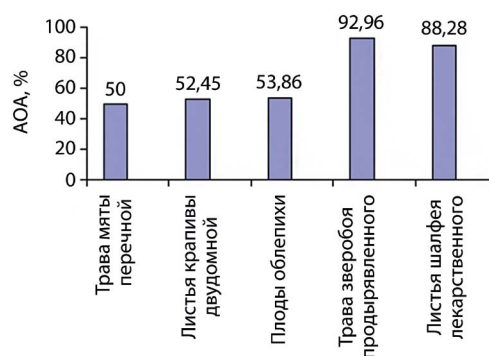


**Рисунок 2.** Значения показателя АОА в пересчёте на кверцетин, мг/г

**Figure 2.** AOA values in terms of quercetin, mg/g

новую кислоты, а также пирокатехин, но не дифференцировать их по группам [5]. Данный метод, однако, широко используется многими исследователями и может быть применен для первичной оценки АОА растительных объектов.

В работе также использован метод оценки АОА на начальных этапах свободнорадикального окисления по ингибированию супероксидрадикала в реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде при длине волны 347 нм [5, 17]. Величина АОА извлечения из свежих плодов облепихи крушиновидной, полученного с применением 96 % этанола, определенная указанным способом, составила 53,86 %, что свидетельствует о наличии АОА (рисунок 3).

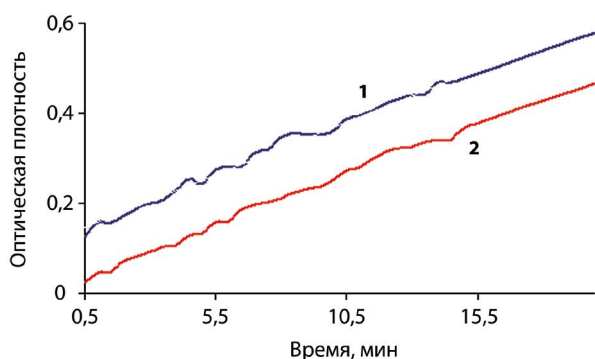


**Рисунок 3.** Значения АОА различных растительных объектов

**Figure 3.** AOA values of various plant objects

Зависимость  $D_{347}$  от времени реакции аутоокисления адреналина в отсутствии (1) и в присутствии извлечения из плодов облепихи (2) представлена на рисунке 4.

В методике с использованием адреналина не указывается точное время, через которое следует измерять оптическую плотность испытуемого раствора, что затрудняет ее применение для стандартизации и



**Рисунок 4.** Зависимость  $D_{347}$  от времени реакции аутоокисления адреналина в отсутствие (1) и в присутствии извлечения из плодов облепихи (2)

**Figure 4.** The dependence of  $D_{347}$  on the reaction time of the autooxidation of adrenaline in the absence (1) and in the presence of extract from sea buckthorn fruits (2)

оценки качества плодов облепихи. Результаты расчета АОА извлечения из свежих плодов облепихи в зависимости от времени определения  $D_{347}$  представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Значение АОА извлечения из свежих плодов облепихи в зависимости от времени определения

**Table 2.** The value of АОА extraction from fresh fruits of sea buckthorn, depending on the time of determination

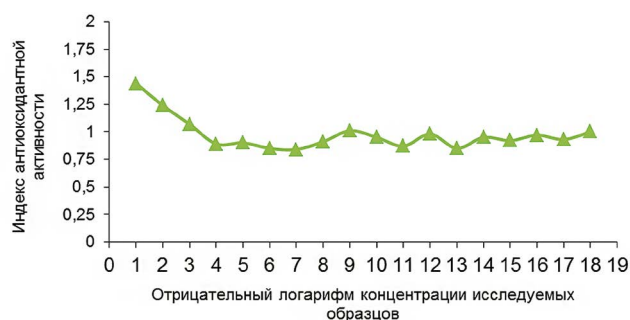
| № п/п | Время, мин | АОА, % |
|-------|------------|--------|
| 1     | 0,5        | 80,33  |
| 2     | 3          | 53,83  |
| 3     | 5          | 44,93  |
| 4     | 7          | 36,52  |
| 5     | 10         | 30,63  |
| 6     | 15         | 21,83  |
| 7     | 20         | 19,24  |

Данные таблицы 2 свидетельствуют о постепенном снижении значения АОА извлечения с течением времени, что связано с участием антиоксидантов в активном торможении свободнорадикального окисления, в результате происходит снижение их активности.

Полученные данные, в сравнении с другими известными источниками АО (рисунок 3), свидетельствуют о перспективности использования данного вида ЛРС и препаратов на его основе в практической медицине в качестве источника АО.

Однако следует отметить, что, наряду с положительными моментами (доступность и экспрессность), данный метод имеет и недостатки. Результаты, полученные в разное время экспозиции, сильно разнятся между собой, что обуславливает большую ошибку определения.

Оценку антиоксидантного действия исследуемого объекта биологическим методом, проводили в соответствии со значениями индекса биологической активности (рисунок 5). Анализируя полученные данные, можно отметить, что отвар плодов облепихи крушиновидной проявляет активность в концентрациях от



**Рисунок 5.** Зависимость индекса антиоксидантной активности\* отвара плодов облепихи крушиновидной от концентрации в растворе

\*IBA от  $1.000 + 0.100$  объект активностью не обладает; IBA  $> 1.000 + 0.100$  объект повышает жизнеспособность клеток; IBA  $< 1.000$  объект снижает жизнеспособность клеток

**Figure 5.** The dependence of the antioxidant activity index\* decoction of fruits of sea buckthorn buckthorn from concentration in solution

\*IBA from  $1.000 + 0.100$  the object does not have activity; IBA  $> 1.000 + 0.100$  object increases cell viability; IBA  $< 1.000$  object reduces cell viability

$1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-3}$ , повышая устойчивость клеток к воздействию процессов свободнорадикального окисления примерно на 20–30 %.

Основным достоинством данного метода, наряду с доступностью и минимальной стоимостью одного анализа, является использование живой культуры инфузорий (тест *in vivo*), что дает возможность ожидать максимальной корреляции полученных результатов с действием исследуемых объектов на более сложно устроенные многоклеточные биологические организмы. Сущность метода заключается в выявлении характера действия исследуемого вещества на механизмы адаптации и резистентности клетки на воздействие на нее разрешающего внешнего неблагоприятного фактора. Однако, к недостаткам следует отнести трудоемкость и длительность данной методики, а также первичность получаемых результатов, требующих дополнительных исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, определена суммарная АОА водных и водно-спиртовых извлечений из плодов облепихи крушиновидной с использованием различных методик. Установлено, что наибольшее содержание АО в извлечении наблюдается при использовании 96% этанола в качестве экстрагента. Исследовано влияние полярности экстрагента на значение суммарной АОА полученных извлечений. Выявлена обратно пропорциональная зависимость величины АОА от полярности экстрагента. При помощи трех методов показана перспективность использования плодов облепихи крушиновидной и препаратов на их основе в качестве источника АО. Полученные данные, несомненно, открывают новые возможности применения давно из-

вестного растения и подтверждают целесообразность и перспективность его использования для получения новых лекарственных форм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Букштынов А. Д., Трофимов Т. Т., Ермаков Б. С. и др. Облепиха. *Лесная промышленность*. 1978: 192.
2. Тринеева О. В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной. *Издательский дом ВГУ*. 2016: 224.
3. Тринеева О. В., Сливкин А. И. Исследование мембраностабилизирующей, антиоксидантной и антитоксической активности водных извлечений из лекарственного растительного сырья (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) на тест-системе *Paramecium caudatum*. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016; 1: 165–169.
4. Тринеева О. В., Сафонова И. И., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Определение антиоксидантной активности извлечений из плодов облепихи крушиновидной. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2012; 2: 266–268.
5. Тринеева О. В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 4(21): 180–197.
6. Кайшев А. Ш., Реккандт С. А., Кайшева Н. Ш., Челомбитко В. А. Антиоксидантная активность биоконпозиций на основе спиртовых отходов. *Фармация*. 2009; 5: 7–10.
7. Хайруллина В. Р., Гарифуллина Г. Г., Герчиков А. Я. Антиокислительная активность экстрактов растений сем. *Geranlaceae*, *Rosaceae* на примере модельной реакции окисления изопропилового спирта. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005; 3: 28–30.
8. Хасанов В. В., Рыжова Г. Л., Мальцева Е. В. Методы исследования антиоксидантов. *Химия растительного сырья*. 2004; 3: 63–75.
9. Лапин А. А., Борисенков М. Ф., Карманов А. П., Бердник И. В., Кочева Л. С., Мусин Р. З., Магдеев И. М. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения. *Химия растительного сырья*. 2007; 2: 79–83.
10. Самусенко А. Л. Исследование антиоксидантной активности эфирных масел лимона, розового грейпфрута, кориандра, гвоздики и их смесей методом капиллярной газовой хроматографии. *Химия растительного сырья*. 2011; 3: 107–112.
11. Конкина И. Г., Грабовский С. А., Муринов Ю. И., Кабальнова Н. Н. Сравнительная оценка реакционной способности кверцетина и дигидрокверцетина по отношению к пероксильным радикалам. *Химия растительного сырья*. 2011; 3: 207–208.
12. Огай М. А., Степанова Э. Ф., Холодов Д. Б., Николаевский В. А. Антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект таурина. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2011; 1: 186–191.
13. Шадрин И. А. Токсикологический анализ некоторых кормов по реакции выживаемости инфузории *Paramecium caudatum*. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2008; 2: 128–134.
14. Хасанова С. Р., Плеханова Т. И., Гашимова Д. Т., Галиахметова Э. Х., Клыш Е. А. Сравнительное изучение антиоксидантной активности растительных сборов. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2007; 1: 163–166.
15. Максимова Т. В., Никулина И. Н., Пахомов В. П. и др. Способ определения антиокислительной активности. Номер патента: 2170930. Дата публикации: 20.07.2001 г. Заявитель(и) и патентообладатель: Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова.
16. Рябинина Е. И., Зотова Е. Е., Ветрова Е. Н. и др. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина. *Химия растительного сырья*. 2011; 3: 117–121.
17. Бузлама В. С. Способ отбора веществ – адаптогенов: Авт. свид. СССР № 9901189, 1982.

18. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. 2015; 2: 1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/)
19. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. 2018; 4: 7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

## REFERENCES

1. Buktshytynov A. D., Trofimov T. T., Ermakov B. S. et al. Sea buckthorn. *Forest industry*. 1978: 192 (In Russ.).
2. Trineeva O. V. Comprehensive study of the content and specific profile of biologically active substances of buckthorn fruits. *Voronezh State University Publishing House*. 2016: 224 (In Russ.).
3. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Investigation of the membrane stabilizing, antioxidant and antitoxic activity of aqueous extracts from medicinal plant materials (for example, fruits of sea buckthorn buckthorn and dioica nettle leaves) on the test system *Paramecium caudatum*. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016; 1: 165–169 (In Russ.).
4. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determination of antioxidant activity of extracts from buckthorn buckthorn fruits. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2012; 2: 266–268 (In Russ.).
5. Trineeva O. V. Methods for determining the antioxidant activity of objects of plant and synthetic origin in pharmacy. *Drug development & registration*. 2017; 4(21): 180–197 (In Russ.).
6. Kaishev A. Sh., Rekkandt S. A., Kaysheva N. Sh., Chelombitko V. A. Antioxidant activity of bio-compositions based on alcohol wastes. *Pharmacy*. 2009; 5: 7–10 (In Russ.).
7. Khayrullina V. R., Garifullina G. G., Gerchikov A. Ya. Antioxidant activity of plant extracts of the family *Geranlaceae*, *Rosaceae* on the example of a model reaction of oxidation of isopropyl alcohol. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2005; 3: 28–30 (In Russ.).
8. Khasanov V. V., Ryzhova G. L., Maltseva E. V. Methods for the study of antioxidants. *Chemistry of plant materials*. 2004; 3: 63–75 (In Russ.).
9. Lapin A. A., Borisenkov M. F., Karmanov A. P., Berdnik I. V., Kocheva L. S., Musin R. Z., Magdееv I. M. Antioxidant properties of plant products. *Chemistry of plant materials*. 2007; 2: 79–83 (In Russ.).
10. Samusenko A. L. The study of the antioxidant activity of essential oils of lemon, pink grapefruit, coriander, cloves and their mixtures by capillary gas chromatography. *Chemistry of plant materials*. 2011; 3: 107–112 (In Russ.).
11. Konkina I. G., Grabovsky S. A., Murinov Yu. I., Kabalnova N. N. Comparative evaluation of the reactivity of quercetin and dihydroquercetin with respect to peroxy radicals. *Chemistry of plant materials*. 2011; 3: 207–208 (In Russ.).
12. Ogai M. A., Stepanova E. F., Kholodov D. B., Nikolaevsky V. A. Antioxidant and membrane stabilizing effect of taurine. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2011; 1: 186–191 (In Russ.).
13. Shadrin I. A. Toxicological analysis of some feeds according to the survival reaction of the ciliates *Paramecium caudatum*. *Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University*. 2008; 2: 128–134 (In Russ.).
14. Khasanova S. R., Plekhanova T. I., Gashimova D. T., Galiakhmetova E. Kh., Klysh E. A. Comparative study of antioxidant activity of plant collections. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2007; 1: 163–166 (In Russ.).
15. Maksimova T. V., Nikulina I. N., Pakhomov V. P. et al. Method for determining antioxidant activity. Patent number: 2170930. Date of publication: July 20, 2001. Applicant(s) and patent holder: Moscow Medical Academy named after I. M. Sechenova (In Russ.).
16. Ryabinina E. I., Zotova E. E., Vetrova E. N. et al. A new approach to assessing the antioxidant activity of plant materials in the study of the process of autooxidation of adrenaline. *Chemistry of plant materials*. 2011; 3: 117–121 (In Russ.).
17. Buzlama B. C. Method of selection of substances – adaptogens: Auth. testimonial. USSR No. 9901189, 1982 (In Russ.).
18. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition. 2015; 2: 1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/) (In Russ.).
19. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. 2018; 4: 7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-53-60>  
УДК 615.9



Оригинальная статья/Research article

## Химико-токсикологический анализ антиретровирусных препаратов

Т. Н. Комаров<sup>1\*</sup>, М. В. Белова<sup>2,3</sup>, Д. Д. Столярова<sup>3</sup>, И. Е. Шохин<sup>1</sup>, Д. С. Богданова<sup>1</sup>,  
О. А. Мискив<sup>1</sup>, Ю. В. Медведев<sup>1,3</sup>, И. М. Коренская<sup>4</sup>

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

2 – ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н. В. Склифосовского» Департамента здравоохранения города Москвы, 129090, г. Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3

3 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

4 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

\*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 18.10.2019. Статья принята к печати: 22.11.2019

### Резюме

**Введение.** Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) продолжает оставаться главной социально значимой инфекцией во всем мире. ВИЧ-инфицированным пациентам оказывается медицинская помощь, в том числе фармакотерапия антиретровирусными препаратами (АРВ). Как и все лекарственные препараты, АРВ имеют ряд побочных действий, которые стоит принимать во внимание при их назначении в составе высокоактивной антиретровирусной терапии. Нередки случаи, когда побочные действия АРВ становились причиной поступления пациентов в отделения токсикологии. Поэтому разработка новых методик анализа АРВ в биологических жидкостях для своевременной диагностики острых отравлений данной группы веществ является актуальной на сегодняшний день.

**Цель.** Целью исследования является разработка методики скрининг-анализа атазанавира, абакавира, невирапина, ритонавира, лопинавира, зидовудина, дарунавир и эфавиренза в моче для идентификации данных веществ как возможных токсикантов при отравлениях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

**Материалы и методы.** Идентификацию данной группы АРВ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения метанолом.

**Результаты и обсуждение.** Подобраны оптимальные условия пробоподготовки, хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения исследуемых АРВ. Данная методика была апробирована на образцах мочи пациентов отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств (ООСПР) с острыми отравлениями АРВ.

**Заключение.** Разработана методика идентификации атазанавира, абакавира, невирапина, ритонавира, лопинавира, зидовудина, дарунавир и эфавиренза в моче человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика может быть использована для идентификации данных веществ как возможных токсикантов при отравлениях. Перспектива развития темы: расширение группы анализируемых веществ, разработка методики количественного определения исследуемых АРВ в биологических жидкостях.

**Ключевые слова:** атазанавир, абакавир, невирапин, ритонавир, лопинавир, зидовудин, дарунавир, эфавиренз, ВЭЖХ-МС/МС, химико-токсикологический анализ.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Т. Н. Комаров участвовал в разработке аналитической методики. Д. Д. Столярова, О. А. Мискив, Д. С. Богданова участвовали в подготовке литературного обзора, пробоподготовке и анализе образцов методом ВЭЖХ-МС/МС. М. В. Белова участвовала в разработке научного направления исследования и предоставила образцы для анализа. И. Е. Шохин, И. М. Коренская, Ю. В. Медведев и все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

**Для цитирования:** Комаров Т. Н., Белова М. В., Столярова Д. Д., Шохин И. Е., Богданова Д. С., Мискив О. А., Медведев Ю. В., Коренская И. М. Химико-токсикологический анализ антиретровирусных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 53–60.

## Chemical and Toxicological Analysis of Antiretroviral Drugs

Timofey N. Komarov<sup>1\*</sup>, Maria V. Belova<sup>2,3</sup>, Daria D. Stolyarova<sup>3</sup>, Igor E. Shohin<sup>1</sup>,  
Dana S. Bogdanova<sup>1</sup>, Olga A. Miskiv<sup>1</sup>, Yuri V. Medvedev<sup>1,3</sup>, Irina M. Korenskaya<sup>4</sup>

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department, 3, Bol'shaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia

3 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

4 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

\*Corresponding author: Timofey N. Komarov. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Received: 18.10.2019. Accepted: 22.11.2019

### Abstract

**Introduction.** Human Immunodeficiency Virus (HIV) is one of the main socially significant infection all over the world. HIV-positive patients take medical care, including antiretroviral drugs (ARVs) pharmacotherapy. Like all drugs, ARVs have lots of side effects that should be taken when prescribing drugs as part of highly active antiretroviral therapy. There are many cases when side effects of ARVs caused patients to enter the toxicology department. Therefore, the development of new methods for the analysis of ARV in biological fluids for the timely diagnosis of treatment of poisoning of this group of drugs is relevant today.

**Aim.** The aim of this study is development of screening analysis of atazanavir, abacavir, nevirapine, ritonavir, lopinavir, zidovudine, darunavir and efavirenz in the urine to identify these drugs as possible toxicants for poisoning by high-performance liquid chromatography with tandem mass-selective detection (HPLC-MS/MS).

**Materials and methods.** Identification of ARV was performed by HPLC-MS/MS. Methanol precipitation method was used as a sample preparation.

**Results and discussion.** The optimal conditions for sample preparation, chromatographic separation, and mass-spectrometric detection were selected to determine the studied ARVs. This method was tested on urine samples from patients in the Department of Acute Poisoning and Somatopsychiatric Disorders (OOSPD) with acute ARV poisoning.

© Комаров Т. Н., Белова М. В., Столярова Д. Д., Шохин И. Е., Богданова Д. С., Мискив О. А., Медведев Ю. В., Коренская И. М., 2019

© Komarov T. N., Belova M. V., Stolyarova D. D., Shohin I. E., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Medvedev Yu. V., Korenskaya I. M., 2019

**Conclusion.** This screening method for analyse atazanavir, abacavir, nevirapine, ritonavir, lopinavir, zidovudine, darunavir and efavirenz in human urine has been developed by HPLC-MS/MS. The developed method can be used to identify these drugs as possible toxicants in case of poisoning. The prospect for the development of the topic is the inclusion of new molecules in the method and quantitative determination of the studied ARVs.

**Keywords:** atazanavir, abacavir, nevirapine, ritonavir, lopinavir, zidovudine, darunavir, efavirenz, HPLC-MS/MS, chemical and toxicological analysis.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Timofey N. Komarov have developed an analytical method, Daria D. Stolyarova, Olga A. Miskiv, Dana S. Bogdanova have performed a literature review, sample preparation and sample analysis by HPLC-MS/MS, Maria V. Belova have developed of the scientific direction of the study and provided samples for analysis, Igor E. Shohin, Irina M. Korenskaya and Yuri V. Medvedev and other authors have participated in the discussion of the results.

**For citation:** Komarov T. N., Belova M. V., Stolyarova D. D., Shohin I. E., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Medvedev Yu. V., Korenskaya I. M. Chemical and toxicological analysis of antiretroviral drugs. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 53–60.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) остается главной социально значимой инфекцией во всем мире. На глобальном уровне это заболевание с момента регистрации первых случаев заражения уже унесло более 35 млн человеческих жизней, в 2017 году от причин, связанных с ВИЧ, во всем мире умерло около 1 млн человек. На начало 2019 года кумулятивное количество зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции среди граждан РФ составило 1 326 239 человек, в стране проживало 1 007 369 зарегистрированных россиян с верифицированным диагнозом «ВИЧ-инфекция», исключая 318 870 умерших больных [1].

ВИЧ-инфицированным пациентам оказывается медицинская помощь, в том числе фармакотерапия антиретровирусными препаратами (АРВ). Как и все лекарственные препараты, АРВ имеют ряд побочных действий, которые стоит брать во внимание при их назначении в составе высокоактивной антиретровирусной терапии. Нередки случаи, когда побочные действия АРВ становились причиной поступления пациентов в отделение токсикологии. Также многие АРВ могут влиять на фармакокинетику совместно принимаемых лекарственных и наркотических веществ. В результате этого могут возникать нежелательные токсические состояния.

Найдено упоминание о клиническом случае острого экзогенного отравления препаратом Ретровир (МНН Зидовудин) у новорожденного ребёнка, ВИЧ-инфицированного внутриутробно. Отравление произошло непреднамеренно в связи с превышением разовых и суточной доз зидовудина в течение 2 дней и выразилось в диарее (до 10 раз в сутки), острой почечно-печеночной недостаточности, поражении нервной системы и кожных покровов. Обращает на себя внимание случай выраженных психоневрологических расстройств у пациента 33-х лет при комплексной АРВ терапии (эфовиренз, тенофовир, эмтрицитабин) связанные с генетически обусловленной ферментопатией – нарушением функции CYP2B6 [3].

Таким образом, проблема острых отравлений АРВ актуальна на сегодняшний день. Причинами интоксикации данными препаратами могут быть: несоблюдение режима дозирования (то есть непреднамеренное отравление), генетические отклонения в системе цитохрома P450, а также осознанное потребление повышенных доз с целью суицида.

Цель исследования: разработать скрининг-анализ антиретровирусных препаратов в моче методом ВЭЖХ-МС/МС для идентификации данных веществ при проявлении побочных эффектов и острых отравлений ими, а также для контроля почечной экскреции при терапевтическом приеме АРВ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Оборудование

Для идентификации абакавира, зидовудина, невирапина, эфовиренза, атазанавира, дарунавира, лопинавира, ритонавира в моче человека использовался жидкостной хроматограф Nexera XR с tandemным масс-селективным детектором LCMS-8040 («Shimadzu Corporation», Япония). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91) «Shimadzu Corporation», Япония.

### Реактивы

Были использованы следующие реактивы: вода Milli-Q; ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Panreac, Испания); метанол (класс «UHPLC-grade», J.T.Baker, Нидерланды); муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore, США); трифторуксусная кислота (класс «for synthesis», Panreac, Испания).

### Стандартные растворы

Для приготовления рабочего раствора были использованы стандартные образцы абакавира сульфата (USP Reference Standard), зидовудина (USP Reference Standard), невирапина (USP Reference Standard), эфовиренза (USP Reference Standard), атазанавира сульфата, (USP Reference Standard), дарунавира (Sigma, содержание 98,0 %), лопинавира (USP Reference Standard), ритонавира (USP Reference Standard).

Смешанный рабочий раствор абакавира, зидовудина, невирапина, эфовиренза, атазанавира, дарунавира, лопинавира и ритонавира готовили путем растворения навесок субстанций в метаноле, разведением и смешиванием исходных стандартных растворов до концентраций 1000 нг/мл каждого вещества в смешанном растворе.

## Биологическая матрица

В качестве биологической матрицы была выбрана моча человека. АРВ препараты из выбранной группы преимущественно выводятся почками как в качестве конъюгатов с глюкуроновой кислотой, так и в неизменном виде. Это делает возможным определить наличие данных лекарственных веществ непосредственно в моче пациента при употреблении с целью преднамеренной или случайной (при несоблюдении режима дозирования) интоксикации, а также при терапевтическом применении данных АРВ пациентом для контроля почечной экскреции веществ или при сочетании терапевтического приёма данных АРВ с отравлениями другими веществами.

## Пробоподготовка

Модельные образцы мочи с содержанием исследуемых веществ готовили смешиванием 270 мкл интактной мочи и 30 мкл смешанного рабочего раствора.

К 300 мкл мочи пациента (или к 300 мкл интактной мочи для приготовления бланкового образца), помещённым в центрифужные микропробирки типа «Eppendorf» вместимостью 2 мл, прибавляли 900 мкл метанола, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее 500 мкл супернатанта переносили в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

## Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: YMC Hydrosphere C18, 100 × 2,1 мм; S = 3 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А: вода Milli-Q, элюент В: ацетонитрил.
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1.

Таблица 1. Градиентное элюирование

Table 1. Gradient elution

| Время, мин | Элюент А, % | Элюент В, % | Скорость потока подвижной фазы, мл/мин |
|------------|-------------|-------------|----------------------------------------|
| 0,00       | 90          | 5           | 0,5                                    |
| 1,50       | 90          | 5           |                                        |
| 6,00       | 58          | 100         |                                        |
| 7,50       | 0           | 100         |                                        |
| 8,00       | 0           | 5           |                                        |
| 11,00      | 90          | 5           |                                        |

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–11 мин.
- Параметры источника ионизации: распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, температура блока нагрева 350 °С, напряжение на капилляре +4,5 кВ.
- Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме MRM (Multiple Reaction Monitoring). Осуществлялась регистрация m/z иона-предшествен-

ника на первом аналитическом квадруполе Q1 и m/z ионов-продуктов на втором аналитическом квадруполе Q3. Условия масс-спектрометрического детектирования анализируемых веществ представлены в таблице 2.

Таблица 2. Условия масс-спектрометрического детектирования исследуемых веществ

Table 2. The conditions of mass-spectrometric detection of the investigated substances

| Исследуемое вещество | Ион-предшественник (Precursor m/z) | Ион-продукт (Product m/z) | Режим ионизации |
|----------------------|------------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Атазанавир           | 705,50                             | 335,20                    | +               |
|                      |                                    | 168,10                    |                 |
| Абакавир             | 287,15                             | 191,10                    | +               |
|                      |                                    | 150,05                    |                 |
| Невирапин            | 267,10                             | 226,05                    | +               |
| Ритонавир            | 721,30                             | 296,15                    | +               |
|                      |                                    | 268,15                    |                 |
| Лопинавир            | 629,40                             | 429,20                    | +               |
|                      |                                    | 183,10                    |                 |
|                      |                                    | 155,10                    |                 |
| Зидовудин            | 268,15                             | 127,05                    | +               |
|                      |                                    | 109,90                    |                 |
| Дарунавир            | 548,35                             | 392,20                    | +               |
|                      |                                    | 156,05                    |                 |
|                      |                                    | 69,15                     |                 |
| Эфавиренз            | 314,05                             | 244,20                    | –               |
|                      |                                    | 250,30                    |                 |

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики пробоподготовки

В качестве исходного объекта для идентификации АРВ была выбрана моча. Преимущества использования данного биообъекта заключаются в следующем:

- Доступность больших количеств биоматериала.
- Возможность неинвазивного способа отбора образца, не требующего специально сертифицированных помещений и обученного персонала (как при отборе крови).
- Концентрирование анализируемых АРВ в моче. В результате выведения лекарств почками, в моче происходит накопление как нативных веществ, так и их метаболитов. Их концентрация в этом биообъекте может превышать концентрацию в крови в несколько раз.
- Отсутствие вирусной нагрузки мочи как биологического объекта. Концентрация ВИЧ в моче недостаточна для заражения. Исключения возможны лишь при контаминации мочи кровью, слюной или иными инфицированными выделениями.

В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения как наиболее быстрый и удобный в применении, что особенно актуально в случае работы с диагностикой острых отравлений. Для выбора оптимального осаждающего реагента были проведены

различные варианты пробоподготовки, использующие в качестве осадителя ацетонитрил, метанол и 50 % водный раствор трифторуксусной кислоты (TFA). В результате анализа было отмечено, что наиболее приемлемые результаты с точки зрения последующего хроматографического разделения и воспроизводимости были получены при использовании метанола в качестве осадителя. Данный осаждающий реагент в отличие от ацетонитрила обладает гидрофильными свойствами ( $\log P \text{ CH}_3\text{OH} = -0,77$ ) в большей степени [4], поэтому он хорошо извлекает из матрицы зидовудин ( $\log P = 0,05$ ) [5] и абакавир ( $\log P = 1,1$ ) [6]. Также метанол в отличие от TFA не взаимодействует с исследуемыми АРВ. Из дополнительных преимуществ метанола над другими осадителями следует отметить, что он способен инактивировать ВИЧ в случае контаминации биологического объекта.

### Разработка методики хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

В качестве неподвижной фазы была использована хроматографическая колонка YMC Hydrosphere C18 с модифицированным октадецилсиликагелем. Данный сорбент позволяет эффективно разделять вещества, различные по своим липофильным свойствам, что актуально в анализе данной группы веществ.

Поскольку исследуемые вещества преимущественно являются органическими основаниями, изначально было решено использовать элюенты с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты для повышения ионизации данных веществ в масс-спектрометрическом детекторе (рисунок 1). В ходе подбора условий хроматографического разделения было установлено, что кислый элюент приводит к уменьшению времени удерживания отдельных веществ и смещению их пиков к мертвому времени хроматографической системы. Это снижает эффективность хроматографического разделения и может привести к получению ложноположительных результатов в случае присутствия в моче метаболитов, совпадающих по молекулярным массам, а также схожих по структуре и по путям фрагментации с нативными веществами.

Для повышения буферной емкости элюента были использованы такие модификаторы как формиат аммония, ацетат аммония (рисунок 2), которые также не решили проблему, описанную выше. Использование элюентов без дополнительных модификаторов привело к повышению эффективности разделения исследуемых веществ, при этом незначительно снизив их ионизацию в электропреемнике. На рисунке 3 представлена хроматограмма модельного образца, демонстрирующая пики всех исследуемых АРВ с подобранными условиями хроматографического разделения. Хроматограмма образца интактной мочи представлена на рисунке 4. Она демонстрирует, что в предложенных хроматографических условиях не обнаруживается интерференции пиков исследуемых веществ с фоновыми пиками эндогенных соединений биологической матрицы (мочи).

### Применение разработанной методики в диагностике острых отравлений

Разработанная методика была применена в анализе образцов мочи, полученных из Научно-исследовательского института (НИИ) скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, от ВИЧ-положительных пациентов, поступивших в отделение острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств (ООСПР) с признаками отравления АРВ. Данные о пациентах и результаты скрининга представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты анализа полученных образцов

Table 5. The results of the analysis of obtained samples

| № п/п | Возраст | Пол | Предполагаемый токсикант | Идентификация |
|-------|---------|-----|--------------------------|---------------|
| 1     | 28      | ж   | абакавир                 | +             |
| 2     | 37      | м   | зидовудин                | +             |
| 3     | 35      | м   | эфавиренз                | +             |
| 4     | 42      | ж   | абакавир                 | +             |
| 5     | 34      | м   | атазанавир               | +             |
| 6     | 32      | ж   | эфавиренз                | +             |

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика идентификации атазанавира, абакавира, невирапина, ритонавира, лопинавира, зидовудина, дарунавир и эфавиренза в моче человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика может быть использована для идентификации данных веществ как возможных токсикантов при отравлениях. Перспектива развития темы: расширение группы анализируемых веществ, разработка методики количественного определения исследуемых АРВ в биологических жидкостях.

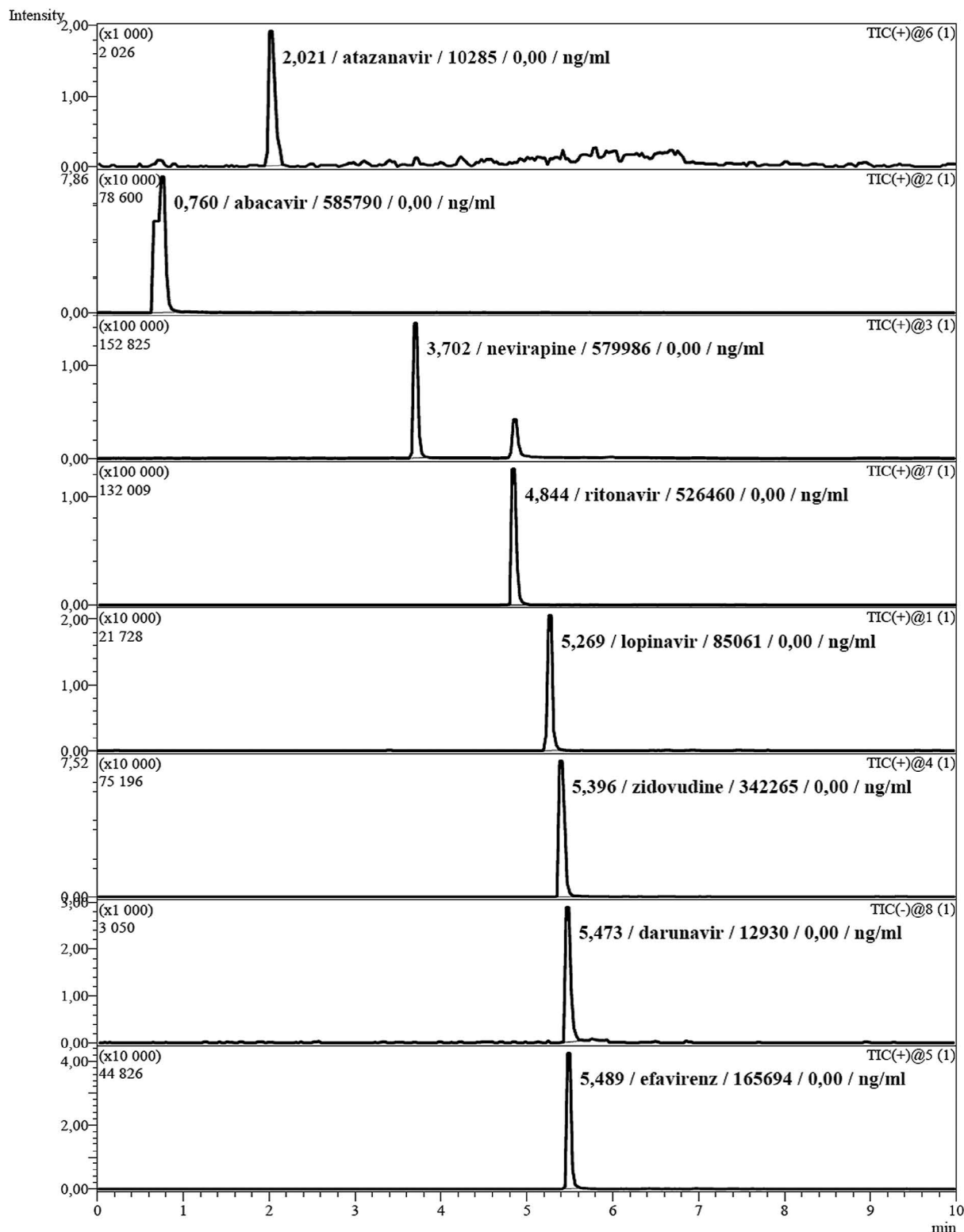
### ЛИТЕРАТУРА

1. Рындич А. А., Сухова А. Г., Суладзе А. Г., Твердохлебова Т. И., Воронцов Д. В. Тенденции и факторы развития эпидемиологического процесса ВИЧ-инфекции на юге России. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(2): 48–57. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-2-48-57.
2. Rotger M., Colombo S., Furrer H. et al. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15: 1–5.
3. Сапожников В. Г., Коняхина А. П. Последствия острого экзогенного отравления препаратом Ретровир (клиническое наблюдение). *Вестник новых медицинских технологий*. 2016; 23(4): 188–196.
4. PubChem. Methanol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>.
5. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>.
6. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01601>.

### REFERENCES

1. Ryndich A.A., Sukhova A.G., Suladze A.G., Tverdokhlebova T.I., Vorontsov D.V. HIV epidemic trends and development factors in southern Russia. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2019; 11(2): 48–57. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-2-48-57 (in Russ.).
2. Rotger M, Colombo S, Furrer H, et al. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 1–5.
3. Sapozhnikov V.G., Konyakhina A.P. The consequences of acute exogenous poisoning with the drug Retrovir (clinical observation). *Bulletin of new medical technologies*. 2016; 23(4): 188–196 (in Russ.).
4. PubChem. Methanol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>.
5. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>.
6. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01601>.

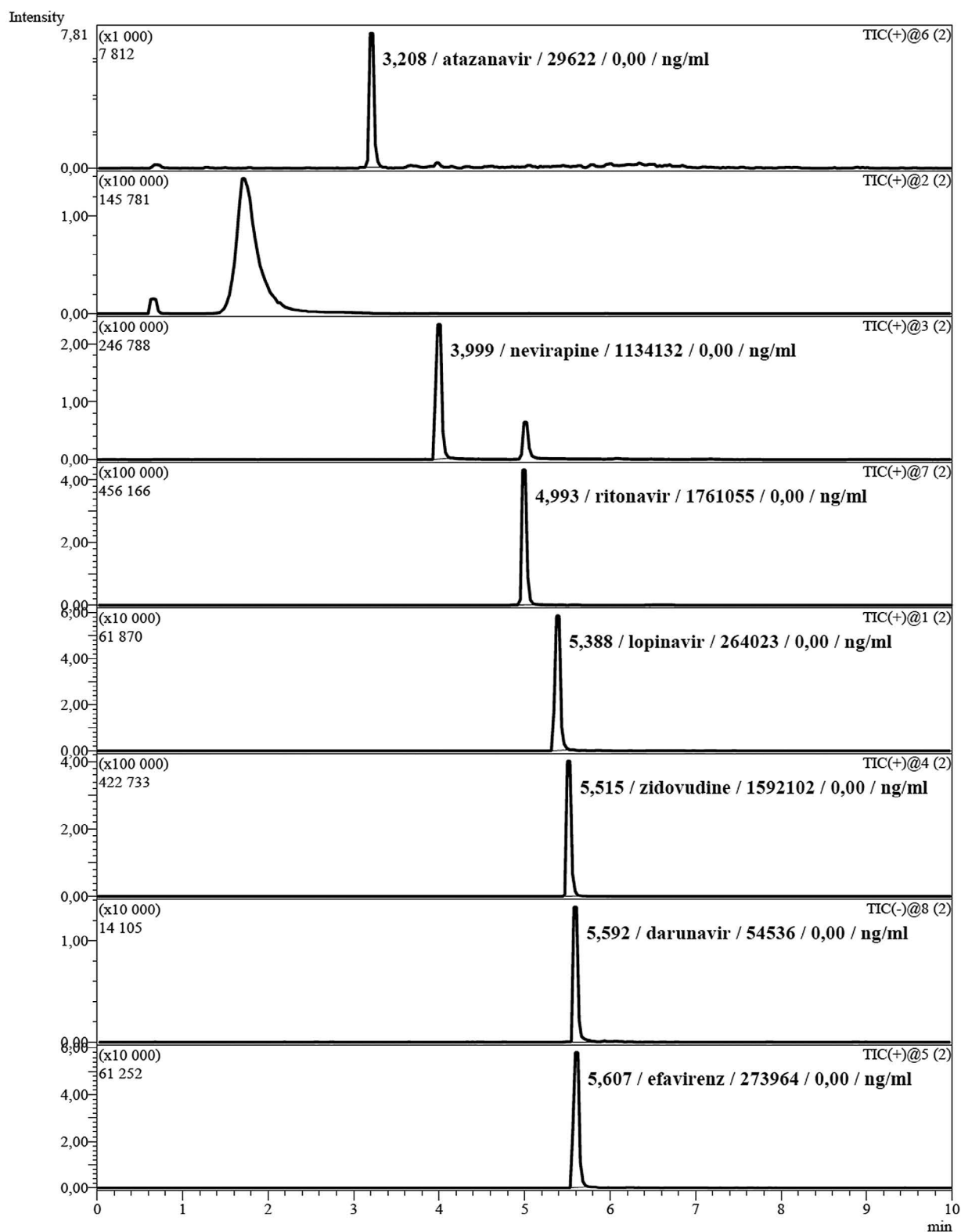
Sample Name : sample 0,1% FA  
Month-Day Acquired : 26.02.2019  
Time Acquired : 14:49:11  
Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 5  
Method File : anti\_HIV\_id.lcm



**Рисунок 1.** Хроматограмма модельного образца с использованием в качестве элюента А 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты

**Figure 1.** Chromatogram of a model sample using 0.1 % formic acid as a eluent A

Sample Name : sample 10 mM NH<sub>4</sub>COOH  
Month-Day Acquired : 26.02.2019  
Time Acquired : 15:07:14  
Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 5  
Method File : anti\_HIV\_id.lcm



**Рисунок 2.** Хроматограмма модельного образца с использованием в качестве элюента А 10 мМ водного раствора аммония ацетата  
**Figure 2.** Chromatogram of a model sample using 10 mM ammonium acetate solution as a eluent A

Sample Name : Sample H20/ACN  
Month-Day Acquired : 26.02.2019  
Time Acquired : 15:32:30  
Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 5  
Method File : anti\_HIV\_id.lcm

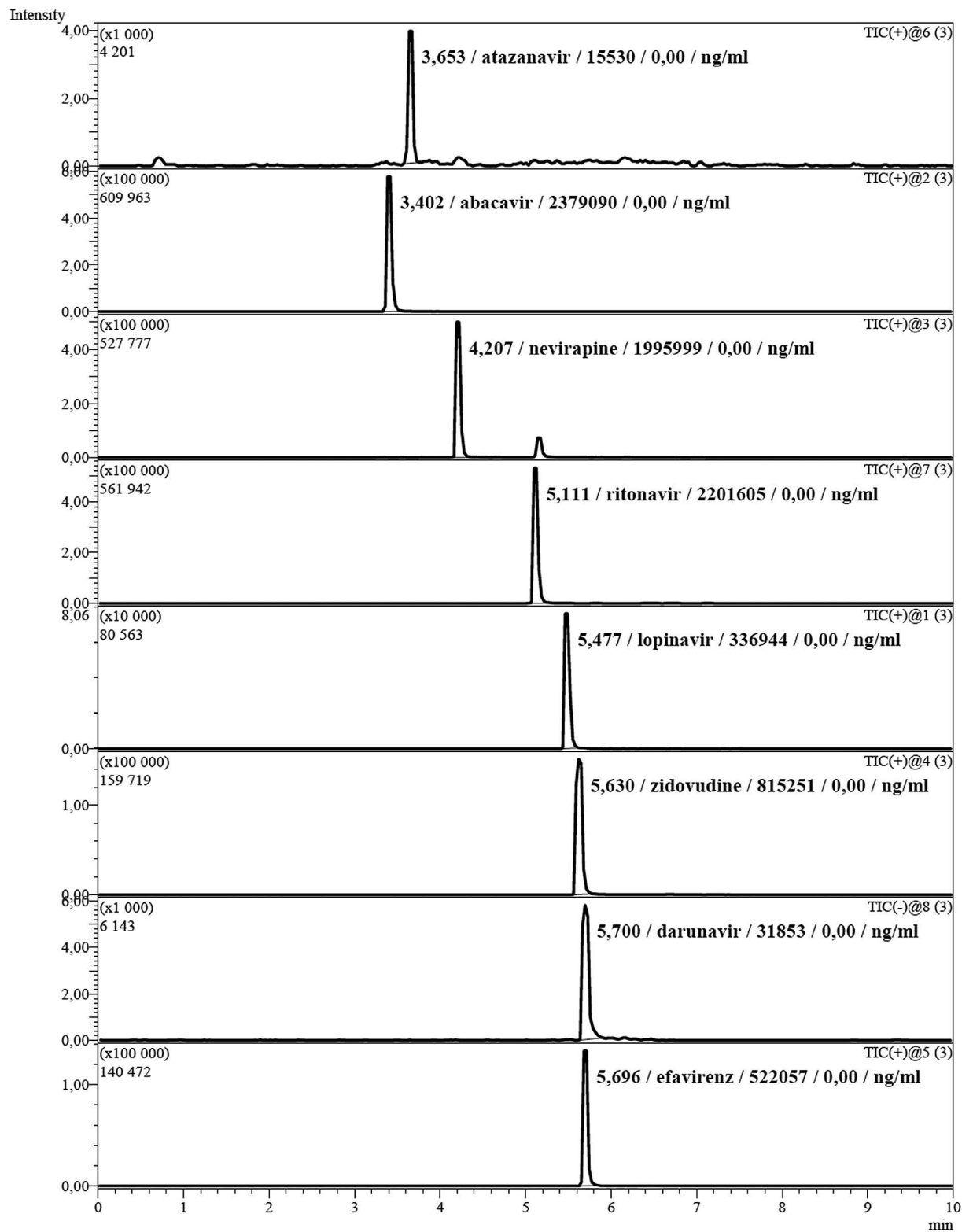


Рисунок 3. Хроматограмма модельного образца без использования модификаторов подвижной фазы

Figure 3. Chromatogram of the model without the use of modifiers

Sample Name : urine blank  
Month-Day Acquired : 26.02.2019  
Time Acquired : 16:09:27  
Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 5  
Method File : anti\_HIV\_id.lcm

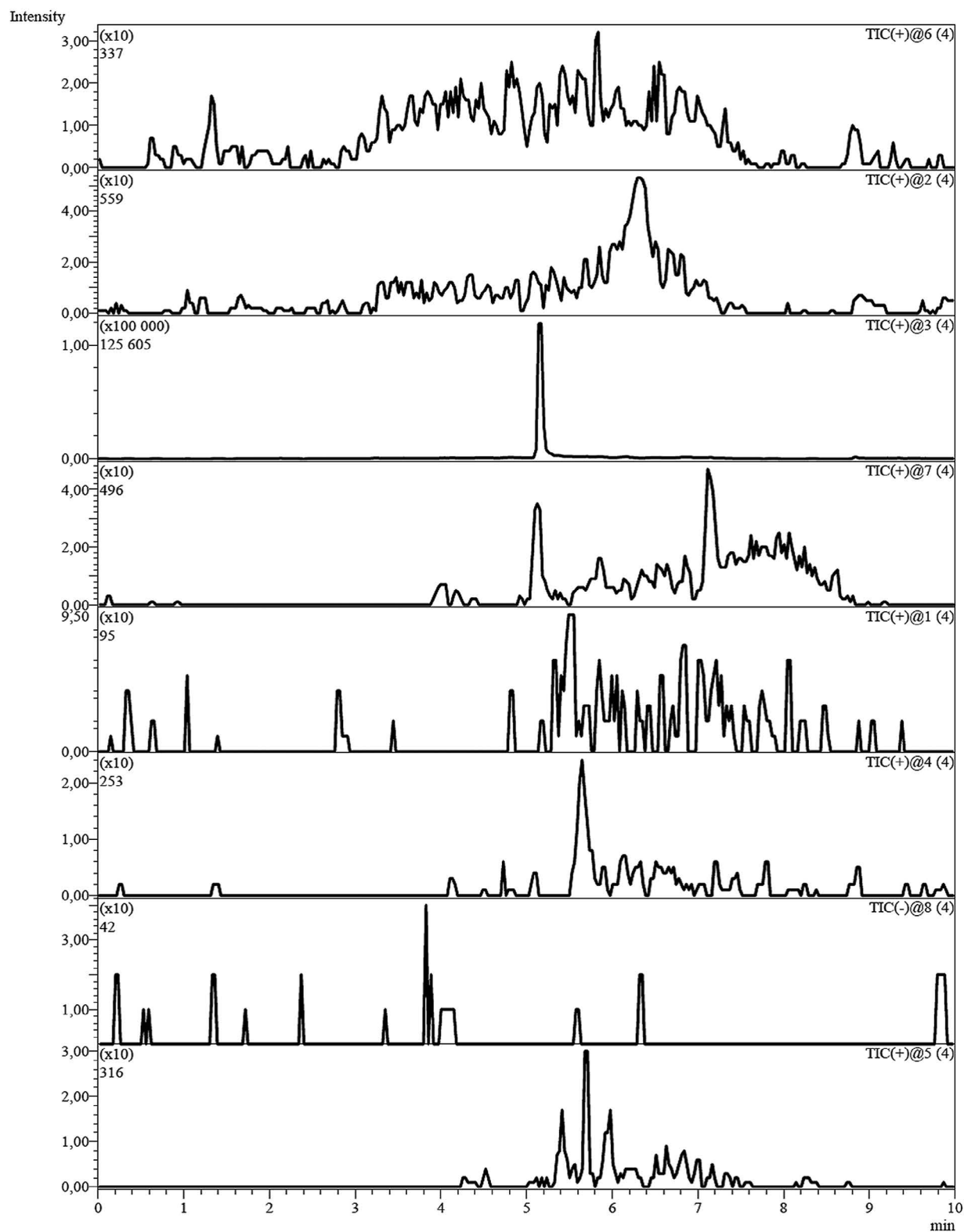


Рисунок 4. Хроматограмма образца интактной мочи

Figure 4. Chromatogram of a blank urine sample

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-61-74>  
УДК 615.9



Оригинальная статья/Research article

## Разработка и валидация методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров<sup>1\*</sup>, Д. С. Богданова<sup>1</sup>, О. А. Мискив<sup>1</sup>, А. В. Алешина<sup>1</sup>, И. Е. Шохин<sup>1</sup>,  
Ю. В. Медведев<sup>1,2</sup>, Н. С. Багаева<sup>1</sup>, И. М. Коренская<sup>3</sup>

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

3 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

\*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 18.10.2019. Статья принята к печати: 22.11.2019

### Резюме

**Введение.** Комбинированные лекарственные препараты, содержащие в составе сальбутамол, бромгексин, амброксол и гвайфенезин, оказывают одновременно муколитическое, отхаркивающее и бронхолитическое действие. Разработка методики совместного определения действующих веществ в биологической жидкости является необходимой процедурой для выполнения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств. В настоящее время литературных данных о совместном определении, бромгексина, амброксола и гвайфенезина нет, но существует ряд опубликованных работ по отдельному определению анализируемого вещества в биологической жидкости. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был выбран способ твердофазной экстракции. В качестве внутренних стандартов использовались дейтерированные производные анализируемых веществ.

**Цель.** Целью исследования является разработка методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

**Материалы и методы.** Количественное определение сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был использован способ твердофазной экстракции.

**Результаты и обсуждение.** Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов.

**Заключение.** Разработана и валидирована методика количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,1–20 нг/мл в плазме крови для сальбутамола, 0,25–25 нг/мл в плазме крови для бромгексина, 0,075–3 нг/мл в плазме крови для амброксола и 10–2000 нг/мл в плазме крови для гвайфенезина. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих сальбутамол, бромгексин, амброксол, гвайфенезин.

**Ключевые слова:** сальбутамол, бромгексин, амброксол, гвайфенезин, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, определение, валидация.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Т. Н. Комаров, Д. С. Богданова, О. А. Мискив, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, Н. С. Багаева проводила статистическую обработку полученных результатов, И. Е. Шохин, И. М. Коренская и Ю. В. Медведев отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

**Для цитирования:** Комаров Т. Н., Богданова Д. С., Мискив О. А., Алешина А. В., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., Коренская И. М. Разработка и валидация методики количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 61–74.

## Development and Validation of Salbutamol, Bromhexine, Ambroxol and Guaifenesin Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS Method

Timofey N. Komarov<sup>1\*</sup>, Dana S. Bogdanova<sup>1</sup>, Olga A. Miskiv<sup>1</sup>, Alexandra V. Aleshina<sup>1</sup>, Igor E. Shohin<sup>1</sup>,  
Yuri V. Medvedev<sup>1,2</sup>, Natalia S. Bagaeva<sup>1</sup>, Irina M. Korenskaya<sup>3</sup>

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

3 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

\*Corresponding author: Timofey N. Komarov. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Received: 18.10.2019. Accepted: 22.11.2019

### Abstract

**Introduction.** Multicomponent oral drugs containing salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin have a mucolytic, expectorant and bronchodilator effect. The development method for determination substances in biological fluids is a main procedure for performing the analytical part of pharmacokinetic studies and bioequivalence studies of multicomponent drugs. There is no published data of the determination of bromhexine,

© Комаров Т. Н., Богданова Д. С., Мискив О. А., Алешина А. В., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., Коренская И. М., 2019

© Komarov T. N., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Aleshina A. V., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S., Korenskaya I. M., 2019

ambroxol and guaifenesin, but there a lot of published methods for divided determination analytes in a biological fluid. This study presents the development and validation of a method of the determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human blood plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. A sample preparation was performed by solid-phase extraction. Deuterated derivatives were used as internal standards.

**Aim.** The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human plasma by HPLC with tandem mass spectrometric detection for performing the analytical part of pharmacokinetic studies.

**Materials and methods.** Determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human plasma by HPLC with tandem mass spectrometric detection. A sample was prepared using solid-phase extraction.

**Results and discussion.** The method was validated by next validation parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, limit of quantification, carry-over and stability.

**Conclusion.** The method of the determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The analytical range of the was 0.1–20 ng/mL in plasma for salbutamol, 0.25–25 ng/mL in plasma for bromhexine, 0.075–3 ng/mL in plasma for ambroxol, and 10–2000 ng/mL in plasma for guaifenesin. Method could be applied to determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin in plasma for PK and BE studies.

**Keywords:** salbutamol, bromhexine, ambroxol, guaifenesin, plasma, HPLC-MS / MS, determination, validation.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Timofey N. Komarov, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv, Alexandra V. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results, Igor E. Shohin, Irina M. Korenskaya and Yuri V. Medvedev carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

**For citation:** Komarov T. N., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Aleshina A. V., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S., Korenskaya I. M. Development and validation of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guuaifenesin determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 61–74.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в составе комбинированной терапии при острых и хронических легочных заболеваний, таких как бронхиальная астма, пневмония, эмфизема легких, коклюш, пневмокониоз и туберкулез легких, для лечения применяются многокомпонентные лекарственные препараты. Данные комбинированные препараты, содержащие в составе салбутамол, бромгексин, амброксол и гвайфенезин, оказывают одновременно муколитическое, отхаркивающее и бронхолитическое действие.

Сальбутамол ((RS)-2-трет-Бутиламино-1-(4-окси-3-оксиметил-фенил)-этанол) – бронхорасширяющее лекарственное средство. Относится к препаратам из группы селективных агонистов  $\beta_2$ -адренорецепторов [1]. Фармакологическое действие сальбутамола является бронхолитическим и токолитическим, направлено на купирование бронхиальной астмы при хронической обструктивной болезни легких, а также при хроническом бронхите, в составе комбинированных препаратов облегчает отхождение мокроты из бронхов [2].

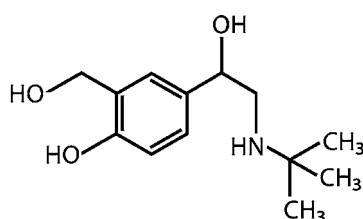


Рисунок 1. Структурная формула сальбутамола

Figure 1. The structural formula of salbutamol

Бромгексин (2-Амино-3,5-дибром-N-циклогексил-N-метилбензолметанамин) – лекарственный препарат, используемый для лечения кашля. Бромгексин оказывает муколитическое, отхаркивающее и противокашлевое действие. Применяется при острых и хронических бронхолегочных заболеваниях, сопровождающихся образованием мокроты повышенной вязкости [2].

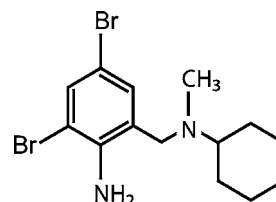


Рисунок 2. Структурная формула бромгексина

Figure 2. The structural formula of bromhexine

Амброксол (4-[(2-амино-3,5-дибромфенил) метиламино]циклогексан-1-ол) – лекарственное препарат, оказывающий муколитическое и отхаркивающее действие, является активным метаболитом бромгексина. Амброксол также используют в качестве самосто-

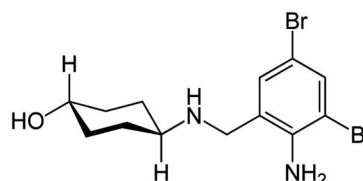


Рисунок 3. Структурная формула амброксола

Figure 3. The structural formula of ambroxol

ятельного лекарственного средства при лечении заболеваний дыхательных путей с образованием вязкой мокроты, остром и хроническом бронхите, пневмонии и бронхиальной астме с затруднением отхождения мокроты [2].

Гвайфенезин (3-(2-Метоксифенокси)-1,2-пропандиол) – лекарственное средство, используемое при заболеваниях дыхательных путей с затрудненным отхождением вязкой мокроты [2]. Гвайфенезин является препаратом из группы секретолитиков, стимулирует секрецию бронхиальных желёз и отделение слизевого секрета [1].

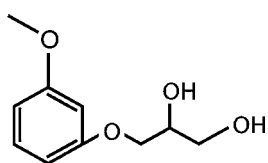


Рисунок 4. Структурная формула гвайфенезина

Figure 4. The structural formula of guaifenesin

В настоящее время в рецензируемых журналах опубликован ряд работ по определению салбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в биологических жидкостях с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения салбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным или одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС, МС). В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки используется способ твердофазной экстракции (ТФЭ) и в некоторых случаях способ жидкость-жидкостной экстракции (таблица 1).

Разработка методики совместного определения действующих веществ является необходимой процедурой для проведения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств. В настоящее время нет опубликованных данных по совместному определению салбутамола бромгексина, амброксола и гвайфенезина в биологических жидкостях.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения салбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был выбран способ твердофазной экстракции. В качестве внутренних стандартов использовались дейтерированные производные анализируемых веществ.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения салбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of salbutamol, bromhexine, ambroxol and guaifenesin

| Аналитический метод                                                             | Пробоподготовка                | Аналитический диапазон, нг/мл | Ссылка |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------|
| <i>Сальбутамол</i>                                                              |                                |                               |        |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | ТФЭ                            | 0,20–15,00                    | [3]    |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | ТФЭ                            | 0,10–50,00                    | [4]    |
| <i>Бромгексин</i>                                                               |                                |                               |        |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | ТФЭ                            | 0,15–30,00                    | [5]    |
| <i>Амброксол</i>                                                                |                                |                               |        |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | ЖЖЭ                            | 0,20–200,00                   | [6]    |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | осаждение белков метанолом     | 1,00–20,00                    | [7]    |
| ВЭЖХ-МС                                                                         | ЖЖЭ                            | 1,00–100,00                   | [8]    |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | осаждение белков ацетонитрилом | 2,00–200,00                   | [9]    |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | осаждение белков ацетонитрилом | 0,50–200,00                   | [10]   |
| <i>Гвайфенезин</i>                                                              |                                |                               |        |
| ВЭЖХ-МС/МС                                                                      | ЖЖЭ                            | 1,00–4000,00                  | [11]   |
| ВЭЖХ-МС                                                                         | ЖЖЭ                            | 25,00–6400,00                 | [12]   |
| ВЭЖХ-МС/МС с применением способа химической ионизацией при атмосферном давлении | ЖЖЭ                            | 5,00–2000,00                  | [13]   |

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LCMS-8040, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и тандемным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония. Для пробоподготовки использованы картриджи Oasis HLB (1 cc, 10 mg, 30 µm), Waters, США.

### Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (UHPLC-grade, J.T.Baker, Нидерланды); муравьиная кислота (for LC-MS, Merck Millipore); аммиак водный (for analysis, Panreac, Испания) вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы салбутамола сульфата (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %), Д9-салбутамола (Toronto Research Chemicals, содержание 98,65 %, изотопная чистота

98,2 %), бромгексина гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %), Д3-бромгексина гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 99,7 %, изотопная чистота 99,5 %), амброксола гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %), Д5-амброксола гидрохлорида (Toronto Research Chemicals, содержание 100,0 %, изотопная чистота 98,0 %), гвайфенезин (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %) и Д3-гвайфенезин (Toronto Research Chemicals, содержание 98,0 %, изотопная чистота 99,8 %).

Исходные стандартные растворы сальбутамола, бромгексина, амброксола, гвайфенезина и дейтерированных производных анализируемых веществ, используемых в качестве внутренних стандартов, готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, промежуточные и рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходные стандартные растворы, промежуточные и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

### Пробоподготовка

Картриджи для твердофазной экстракции, предварительно помещённые в устройство для проведения ТФЭ, подключённое к насосу для фильтрования, активировали последовательной промывкой 500 мкл метанола и 500 мл воды.

К 300 мкл калибровочного образца (либо к 300 мкл интактной плазмы крови для приготовления бланка), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта, затем прибавляли 600 мкл воды, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем загружали на картридж. Далее промывали картриджи 500 мкл воды, затем смывали образец 400 мкл метанола (таблица 2).

Образцы упаривали при 45 °С под током азота до сухого остатка, затем сухой остаток перерастворяли в 100 мкл 10 % раствора муравьиной кислоты, перемешивали и помещали в автосамплер хроматографа.

### Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму) с добавлением 0,08 % аммиака водного (по объёму), элюент В: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле (по объёму) с добавлением 0,08 % аммиака водного (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

| Время, мин | Элюент А, % | Элюент В, % | Скорость потока подвижной фазы, мл/мин |
|------------|-------------|-------------|----------------------------------------|
| 0,00       | 90          | 10          | 1,00                                   |
| 0,50       | 90          | 10          |                                        |
| 5,00       | 25          | 75          |                                        |
| 5,50       | 0           | 100         |                                        |
| 7,00       | 0           | 100         |                                        |
| 7,50       | 90          | 10          |                                        |
| 9,00       | 90          | 10          |                                        |

- Объем вводимой пробы: 10 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–9,00 мин.
- Режим ионизации: положительный.
- Условия детектирования сальбутамола: 240,25 → 148,10 m/z.
- Условия детектирования Д9-сальбутамола: 249,25 → 149,10 m/z.
- Условия детектирования бромгексина: 377,10 → 263,95 m/z; 377,10 → 114,15 m/z.
- Условия детектирования Д3-бромгексина: 380,10 → 263,90 m/z; 380,10 → 117,15 m/z.
- Условия детектирования амброксола: 379,05 → 263,95 m/z.
- Условия детектирования Д5-амброксола: 384,10 → 263,90 m/z.
- Условия детектирования гвайфенезина: 199,15 → 122,10 m/z; 199,15 → 77,10 m/z.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

| Уровень | Концентрация аналита, нг/мл |       |       |         | Концентрация внутреннего стандарта, мл |       |        |        |
|---------|-----------------------------|-------|-------|---------|----------------------------------------|-------|--------|--------|
|         | САЛ                         | БР    | АМБ   | ГВ      | Д9-САЛ                                 | Д3-БР | Д5-АМБ | Д3-ГВ  |
| 1       | 0,10                        | 0,25  | 0,075 | 10,00   | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 2       | 0,25                        | 0,50  | 0,10  | 25,00   | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 3       | 0,50                        | 1,00  | 0,25  | 50,00   | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 4       | 1,00                        | 2,50  | 0,50  | 100,00  | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 5       | 2,50                        | 5,00  | 0,75  | 250,00  | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 6       | 5,00                        | 10,00 | 1,00  | 500,00  | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 7       | 10,00                       | 20,00 | 2,00  | 1000,00 | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |
| 8       | 20,00                       | 25,00 | 3,00  | 2000,00 | 5,00                                   | 5,00  | 1,00   | 500,00 |

- Условия детектирования ДЗ-гвайфенезина: 202,15 → 78,05 m/z.
- Время удерживания салбутамола и Д9-салбутамола: около 2,4 мин.
- Время удерживания бромгексина и ДЗ-бромгексина: около 5,5 мин.
- Время удерживания амброксола и Д5-амброксола: около 4,6 мин.
- Время удерживания гвайфенезина и ДЗ-гвайфенезина: около 4,3 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики

При разработке методики определения действующих веществ в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС необходимо полноценно использовать сочетание разделяющей способности метода жидкостной хроматографии и высокой чувствительности и селективности tandemного масс-спектрометрического детектора, позволяющее достичь максимально эффективных результатов.

Применение tandemного масс-спектрометрического детектирования позволяет достичь высокой чувствительности и селективности методики при определении веществ, но при анализе биологических образцов, содержащих огромное число соединений, являющихся метаболитами действующих (исследуемых) веществ, необходимо подобрать условия хроматографического разделения и удерживания для селективного определения веществ, а также во избежание появления «перекрещивающихся» сигналов детектора и возникновения ложноположительных результатов.

Одной из задач данного исследования являлась разработка методики совместного определения салбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина. Также необходимо было подобрать условия хроматографического разделения и детектирования для дейтерированных производных анализируемых веществ, используемых в качестве внутренних стандартов.

В процессе подбора условий детектирования бромгексина и его метаболита амброксола возникли некоторые трудности. Амброксол является одним из множества метаболитов бромгексина, который образуется из исходного соединения путём N-деметилирования и гидроксирования по циклогексиль-

ному радикалу в пара-положении, вследствие чего имеет схожую структуру и близкую по значению молекулярную массу с бромгексином. При сканировании фрагментарных ионов бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных наиболее интенсивный сигнал был получен от иона-продукта с отношением массы к заряду 263. Амброксол и бромгексин имеют в структурном составе радикалы брома. Природный бром состоит из двух стабильных изотопов  $^{79}\text{Br}$  (50,56 %) и  $^{81}\text{Br}$  (49,44 %). За счет изотопного состава брома, содержащегося в бромгексине и амброксоле, происходит перекрывание сигнала молекулярных ионов бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных при совместном присутствии в анализируемом объекте. В таблице 4 приведены молекулярные массы ионов-прекурсора с учетом изотопной картины и ионов-продуктов бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных.

Для идентификации выше перечисленных веществ подбор масс-спектрометрических условий детектирования не привел к достижению селективных результатов, и была высока вероятность получения ложноположительных значений сигнала в случае наложения зон элюирования исследуемых веществ при недостаточном хроматографическом разделении. Кроме того, подобные перекрещивания могли возникать также в ходе исследования образцов, полученных от добровольцев, в которых возможно присутствие иных метаболитов со схожей структурой. Данные риски многократно повышаются в случае пренебрежения хроматографическим разделением и элюированием исследуемых соединений с мёртвым объёмом.

Таким образом, для достоверного и селективного определения бромгексина и амброксола необходимо обеспечить хроматографическое разделение данных веществ и обеспечить селективное время удерживания.

При выборе условий хроматографического разделения была подобрана колонка Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм; 5 мкм. Определяемые вещества отличаются по показателю липофильности и константе диссоциации. Например, бромгексин является более липофильным в сравнении с остальными анализируемыми веществами. Для достижения удерживания веществ на неподвижной фазе был выбран сорбент, имеющий привитые фенильные группы, так как все определяемые вещества имеют в своем

**Таблица 4. Молекулярные массы ионов-прекурсора и ионов-продукта бромгексина, амброксола и их дейтерированных производных**

**Table 4. The molecular masses of precursor ions and product ions of bromhexine, ambroxol and treeized derivatives**

| Вещество                                                             | Бромгексин                 | ДЗ-бромгексин              | Амброксол<br>(осн. метаболит)   | Д5-амброксол                    |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Отношение массы к заряду иона-прекурсора с учётом изотопной картины* | 375, 376, <b>377</b> , 378 | 379, <b>380</b> , 381, 382 | 377, 378, <b>379</b> , 380, 381 | 382, 383, <b>384</b> , 385, 386 |
| отношение массы к заряду иона-продукта                               | 263                        | 263                        | 263                             | 263                             |

**Примечание:** \* – полужирным шрифтом выделены массы ионов, имевших наибольшую интенсивность.

**Note:** \* – the m/z of ions with the highest intensity are highlighted in bold.

структуре фенильный фрагмент, и по принципу «подобия» данные вещества имеют большее сродство к фенильным сорбентам.

Далее в процессе разработки методики при выборе подвижной фазы были испытаны 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде – элюент А и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, поскольку данные элюенты обеспечивали максимальную ионизацию исследуемых веществ в электроосмосе. При этом салбутамол плохо удерживался на колонке и образовывал несимметричный пик, за счет использования неподходящей подвижной фазы. Эмпирическим путём были подобраны следующие элюенты: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с добавлением 0,08 % аммиака водного – элюент А; 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле с добавлением 0,08 % аммиака водного – элюент В. Данная подвижная фаза обеспечивает достаточную буферную емкость и элюирование всех исследуемых веществ в виде ровных и симметричных пиков.

При выборе пробоподготовки анализируемых объектов были рассмотрены несколько способов: осаждение белков органическим растворителем (метанол или ацетонитрил) и твердофазная экстракция. При осаждении белков ацетонитрилом как более неполярным в сравнении с метанолом пики некоторых анализируемых веществ были несимметричными, и происходило, так называемое «размывание» пика. При осаждении белков метанолом вещества имели высокую степень извлечения и при выбранных условиях хроматографического разделения имели узкую, симметричную форму пика. При использовании данного способа пробоподготовки для определения салбутамол и бромгексина удалось достичь уровня НПКО, 0,100 нг/мл и 0,250 нг/мл соответственно, для амброксола удалось достичь третьего уровня концентраций (таблица 2) – 0,250 нг/мл, для гвайфенезина пятого уровня концентраций (таблица 2) – 250 нг/мл. Для достижения уровня НПКО всех анализируемых веществ в качестве пробоподготовки был выбран способ твердофазной экстракции, который обеспечивает концентрирование аналитов, что актуально при анализе веществ низких концентраций.

Таким образом, была разработана методика совместного определения салбутамол, бромгексина, амброксола и гвайфенезина, были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, а подобранные условия масс-спектрометрического детектирования позволили достичь необходимого уровня НПКО.

### Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [9], а также руководств FDA [10] и ЕМА [11] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);

- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность образцов (стабильность исходного и рабочих растворов ана-лита; стабильность замороженного и размороженного аналита, перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру; краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре; долгосрочная стабильность аналита в матрице при низкотемпературной заморозке).

### Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников и образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентраций салбутамол в диапазоне 0,10 нг/мл – 20,00 нг/мл, бромгексина в диапазоне 0,25 нг/мл – 25,00 нг/мл, амброксола в диапазоне 0,075 нг/мл – 3,00 нг/мл, гвайфенезина в диапазоне 10,00 нг/мл – 2000,00 нг/мл, а также рабочего раствора внутреннего стандарта до концентраций Д9-салбутамол 5,00 нг/мл, Д3-бромгексина 5,00 нг/мл, Д5-амброксола 1,00 нг/мл, Д3-гвайфенезина 500,00 нг/мл. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и с повышенным содержанием липидов. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемых веществ или их сигнал не превышает 20 % от сигнала на уровне НПКО. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 5, 6.

### Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов анализируемых веществ и внутренних стандартов без влияния биологической матрицы ( $W_{y_x}$ ), а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени извлечения анализируемых веществ и внутренних стандартов из биологической матрицы ( $SA_{y_x}$ ).

Эффект матрицы был оценен на нижнем (таблица 2 и 3) и верхнем уровнях (таблица 2, № 8) аналитического диапазона концентраций салбутамол (0,50 нг/мл и 20,00 нг/мл), бромгексина (1,00 нг/мл и 25,00 нг/мл), амброксола (0,25 нг/мл и 3,00 нг/мл) и гвайфенезина (50,00 нг/мл и 2000,00 нг/мл). Для внутренних стандартов (Д9-салбутамол, Д3-бромгексин, Д5-амброксол, Д3-гвайфенезин) эффект матрицы был рассчитан на уровнях 5,00 нг/мл, 5,00 нг/мл, 1,00 нг/мл, 500,00 нг/мл соответственно. Данные представлены в таблице 5.

Sample Name : cal\_1\_0  
Month-Day Acquired : 16.10.2018  
Time Acquired : 19:59:00  
Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 10  
Method File : ascoril\_quant1.mrm.lcm

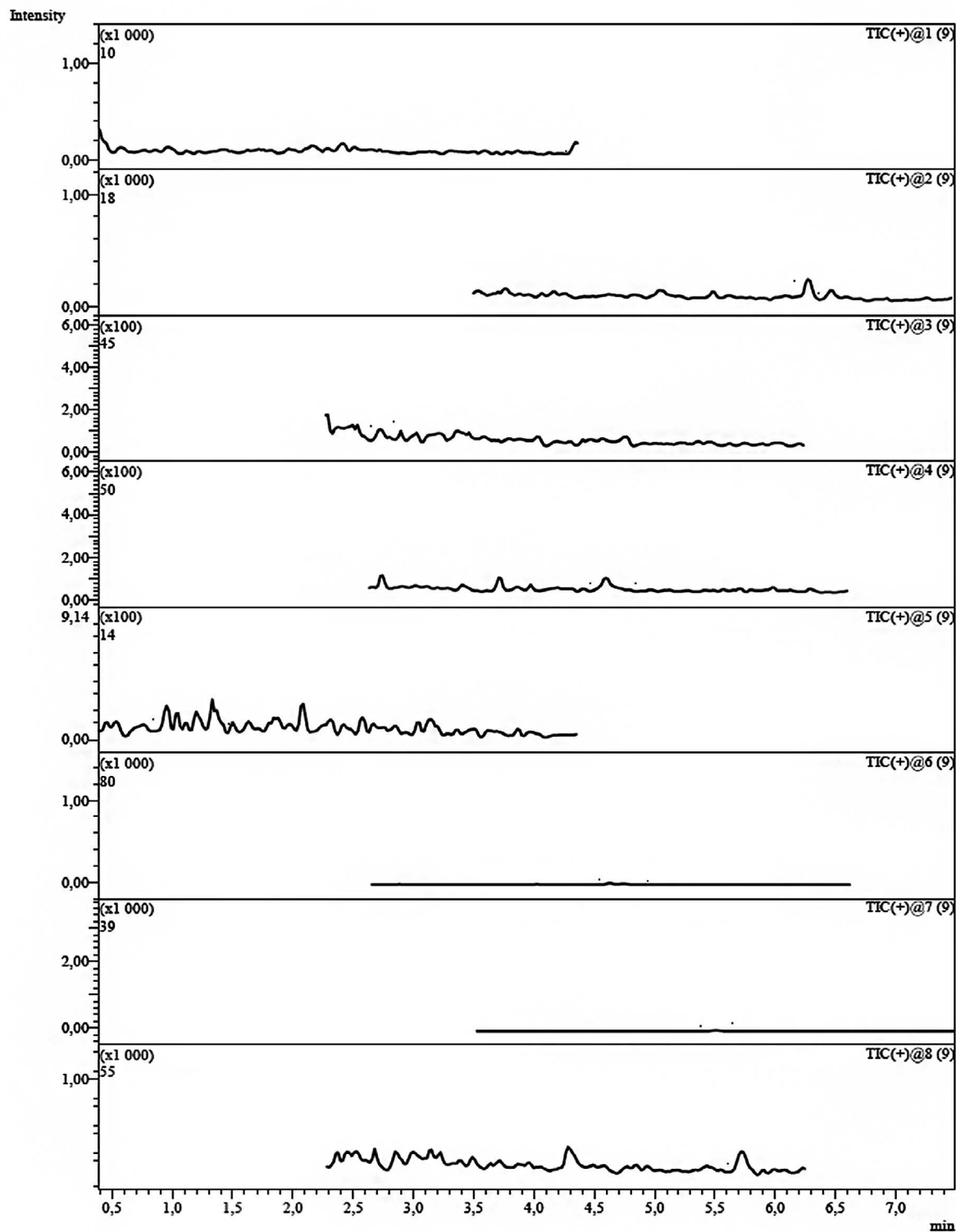


Рисунок 5. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 5. Chromatogram of a blank plasma sample

Sample Name : cal\_1\_7  
Month-Day Acquired : 16.10.2018  
Time Acquired : 19:27:14  
Sample Type : Standard  
Injection Volume : 10  
Method File : ascoril\_quant1 mrm.lcm

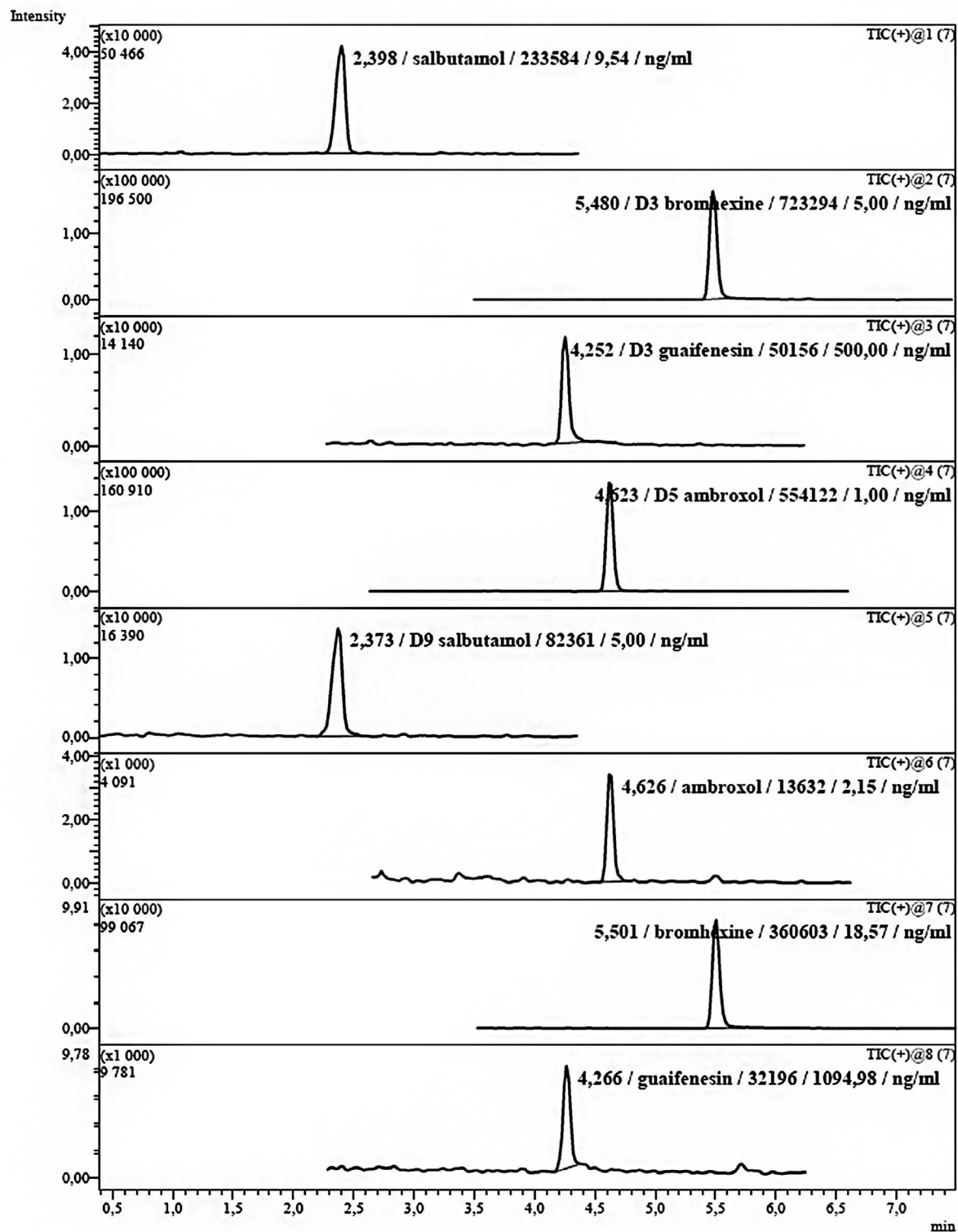


Рисунок 6. Хроматограмма калибровочного образца плазмы крови, уровень № 7 (таблица 3)

Figure 6. Chromatogram of calibration sample, level № 7 (table 3)

**Таблица 5.** Расчёт фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутренних стандартов  
**Table 5.** Calculation of the matrix factor of the analyzed substances, normalized by the matrix factor of internal standards

| №       | Mf анализируемых веществ |      |      |      | Mf внутренних стандартов |       |        |       | Нормализованный Mf |      |       |       |
|---------|--------------------------|------|------|------|--------------------------|-------|--------|-------|--------------------|------|-------|-------|
|         | САЛ                      | БР   | АМБ  | ГВ   | Д9-САЛ                   | Д3-БР | Д5-АМБ | Д3-ГВ | САЛ                | БР   | АМБ   | ГВ    |
| 3-1.    | 1,23                     | 0,98 | 1,00 | 0,92 | 1,14                     | 1,04  | 1,21   | 1,17  | 1,08               | 0,94 | 0,83  | 0,79  |
| 3-2.    | 1,31                     | 0,95 | 1,44 | 1,30 | 1,20                     | 0,96  | 1,25   | 1,23  | 1,09               | 0,99 | 1,16  | 1,06  |
| 3-3.    | 1,33                     | 0,93 | 1,04 | 1,07 | 1,09                     | 0,93  | 0,95   | 1,20  | 1,22               | 1,00 | 1,10  | 0,89  |
| 3-4.    | 1,22                     | 0,82 | 1,25 | 1,08 | 1,07                     | 0,92  | 1,14   | 1,23  | 1,14               | 0,88 | 1,09  | 0,88  |
| 3-5.    | 1,08                     | 0,73 | 1,19 | 1,06 | 1,04                     | 0,90  | 1,15   | 1,12  | 1,03               | 0,81 | 1,03  | 0,95  |
| 3-6.    | 1,19                     | 0,78 | 1,10 | 1,14 | 1,07                     | 0,84  | 1,18   | 1,32  | 1,12               | 0,92 | 0,93  | 0,86  |
| Среднее |                          |      |      |      |                          |       |        |       | 1,11               | 0,93 | 1,02  | 0,91  |
| CV, %   |                          |      |      |      |                          |       |        |       | 5,82               | 7,61 | 12,00 | 10,20 |
| 8-1.    | 1,08                     | 1,01 | 0,87 | 1,46 | 1,33                     | 1,22  | 1,15   | 1,09  | 0,81               | 0,83 | 0,75  | 1,34  |
| 8-2.    | 1,06                     | 1,03 | 0,86 | 1,19 | 1,42                     | 1,18  | 1,13   | 1,12  | 0,74               | 0,87 | 0,76  | 1,06  |
| 8-3.    | 1,03                     | 1,01 | 0,90 | 1,11 | 1,28                     | 1,21  | 1,16   | 0,98  | 0,81               | 0,83 | 0,78  | 1,13  |
| 8-4.    | 1,02                     | 0,99 | 0,78 | 1,43 | 1,32                     | 1,20  | 1,16   | 0,92  | 0,78               | 0,82 | 0,67  | 1,55  |
| 8-5.    | 1,08                     | 1,04 | 0,86 | 1,20 | 1,36                     | 1,16  | 1,17   | 0,99  | 0,79               | 0,90 | 0,73  | 1,21  |
| 8-6.    | 1,06                     | 1,01 | 0,75 | 1,09 | 1,27                     | 1,22  | 1,18   | 0,95  | 0,84               | 0,83 | 0,63  | 1,15  |
| Среднее |                          |      |      |      |                          |       |        |       | 0,79               | 0,85 | 0,72  | 1,24  |
| CV, %   |                          |      |      |      |                          |       |        |       | 4,03               | 3,48 | 7,99  | 14,46 |

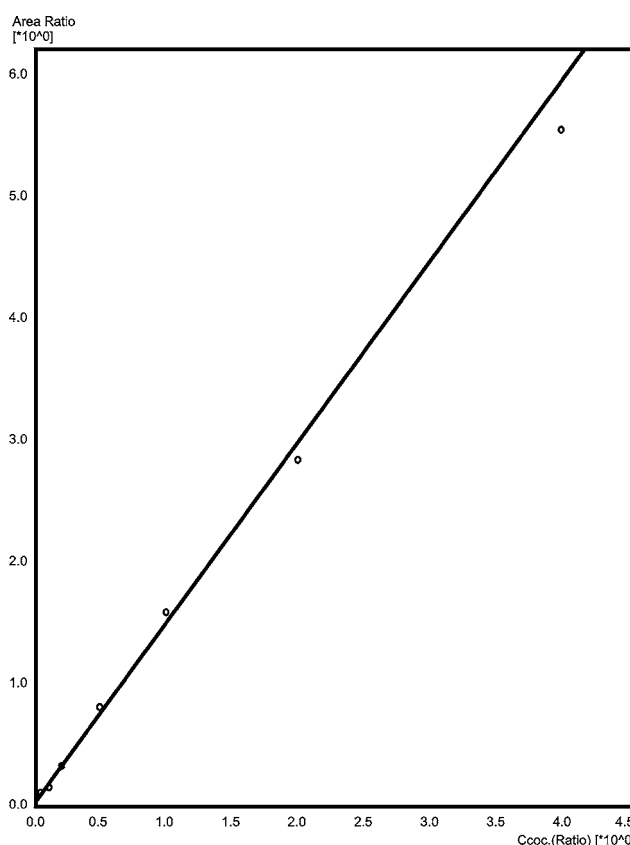
Фактор матрицы рассчитывали, как отношение значения площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного на плазме после осаждения белков, к значению площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали, как отношение значения фактора матрицы анализируемого вещества к фактору матрицы внутреннего стандарта. Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, соответствуют нормам, не более 15 %.

### Калибровочная кривая

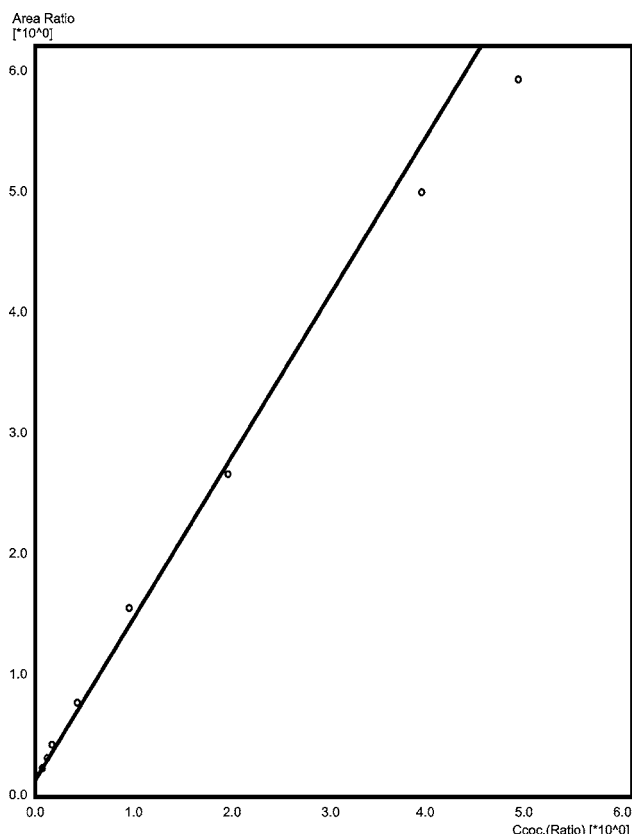
Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора внутреннего стандарта и рабочих стандартных растворов до получения концентраций анализируемых веществ и внутренних стандартов, указанных в таблице 3, соответствующих каждому калибровочному уровню. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта от отношения концентрации аналита к концентрации внутреннего стандарта в плазме крови.

Уравнения калибровочных графиков и коэффициенты корреляции составили для салбутамола  $y = 1,47216 \cdot x + 0,0262065$ ,  $R = 0,9965$ , для бромгексина  $y = 0,130989 \cdot x + 0,0119420$ ,  $R = 0,9958$ , для амброксола  $y = 0,0109012 \cdot x + 0,00118227$ ,  $R = 0,9952$ , для гвайфенезина  $y = 0,285365 \cdot x + 0,0169923$ ,  $R = 0,9953$ . Графики приведены на рисунках 7–10.



**Рисунок 7.** Калибровочный график зависимости отношения площади пика салбутамола к площади пика Д9-салбутамола от отношения концентрации салбутамола к концентрации Д9-салбутамола в плазме крови

**Figure 7.** The calibration curve dependence of the ratio area peak of salbutamol to the D9-salbutamol on the concentration ratio of salbutamol to the D9-salbutamol in plasma



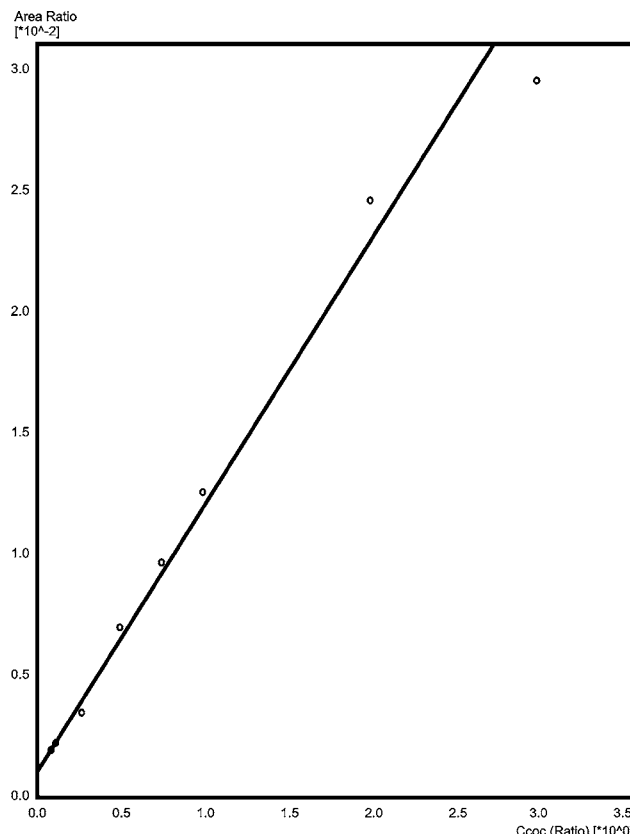
**Рисунок 8.** Калибровочный график зависимости отношения площади пика бромгексина к площади пика Д3-бромгексина от отношения концентрации бромгексина к концентрации Д3-бромгексина в плазме крови

**Figure 8.** The calibration curve dependence of the ratio area peak of bromhexine to the D3-bromhexine on the concentration ratio of bromhexine to the D3-bromhexine in plasma

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 6.

### Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням: НПКО, низкий уровень (таблица 2, № 3), средний уровень (таблица 2,



**Рисунок 9.** Калибровочный график зависимости отношения площади пика амброксола к площади пика Д3-амброксола от отношения концентрации амброксола к концентрации Д3-амброксола в плазме крови

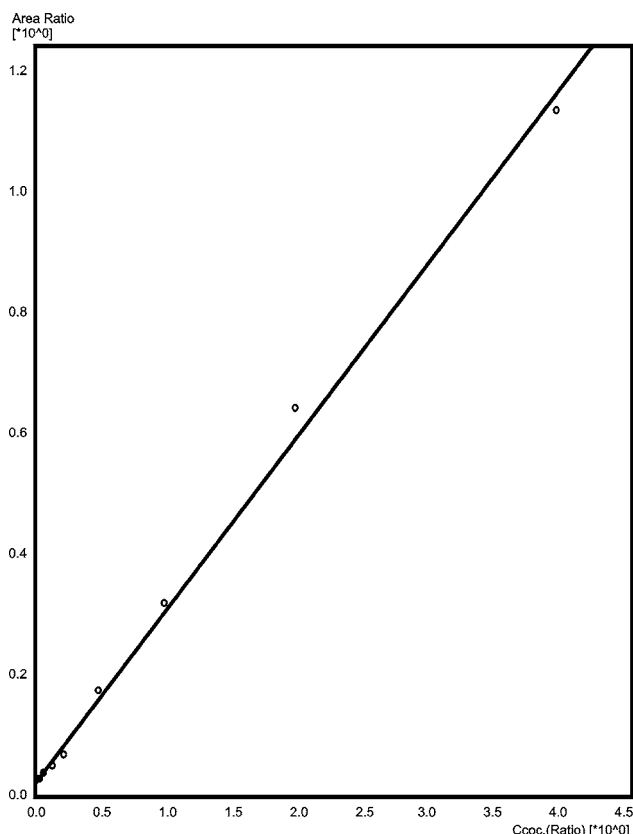
**Figure 9.** The calibration curve dependence of the ratio area peak of ambroxol to the D3-ambroxol on the concentration ratio of ambroxol to the D3-ambroxol in plasma

№ 7), верхний уровень (таблица 2, № 8). Анализ валидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точности и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблице 7.

**Таблица 6.** Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений

**Table 6.** Deviations of analyte concentrations in calibration samples from their nominal values

| № | Концентрация номинальная, нг/мл |       |       |         | Концентрация рассчитанная, нг/мл |       |      |         | E, %   |        |        |        | Норма, не более % |
|---|---------------------------------|-------|-------|---------|----------------------------------|-------|------|---------|--------|--------|--------|--------|-------------------|
|   | САЛ                             | БР    | АМБ   | ГВ      | САЛ                              | БР    | АМБ  | ГВ      | САЛ    | БР     | АМБ    | ГВ     |                   |
| 1 | 0,10                            | 0,25  | 0,075 | 10,00   | 0,10                             | 0,24  | 0,08 | 10,46   | 4,23   | -4,85  | 0,96   | 4,57   | 20                |
| 2 | 0,25                            | 0,50  | 0,10  | 25,00   | 0,22                             | 0,52  | 0,10 | 23,77   | -12,61 | 3,99   | 0,82   | -4,90  | 15                |
| 3 | 0,50                            | 1,00  | 0,25  | 50,00   | 0,49                             | 1,10  | 0,22 | 45,21   | -1,35  | 9,55   | -10,92 | -9,57  | 15                |
| 4 | 1,00                            | 2,50  | 0,50  | 100,00  | 1,08                             | 2,56  | 0,54 | 87,33   | 7,70   | 2,22   | 7,18   | -12,68 | 15                |
| 5 | 2,50                            | 5,00  | 0,75  | 250,00  | 2,66                             | 5,51  | 0,78 | 273,52  | 6,45   | 10,23  | 3,68   | 9,41   | 15                |
| 6 | 5,00                            | 10,00 | 1,00  | 500,00  | 5,33                             | 9,75  | 1,04 | 528,94  | 6,53   | -2,50  | 4,14   | 5,79   | 15                |
| 7 | 10,00                           | 20,00 | 2,00  | 1000,00 | 9,54                             | 18,58 | 2,15 | 1094,98 | -4,57  | -7,13  | 7,42   | 9,50   | 15                |
| 8 | 20,00                           | 25,00 | 3,00  | 2000,00 | 18,72                            | 22,12 | 2,60 | 1957,87 | -6,39  | -11,53 | -13,28 | -2,11  | 15                |



**Рисунок 10.** Калибровочный график зависимости отношения площади пика гвайфенезина к площади пика Д3-гвайфенезина от отношения концентрации гвайфенезина к концентрации Д3-гвайфенезина в плазме крови

**Figure 10.** The calibration curve dependence of the ratio area peak of guaifenesin to the D3-guaifenesin on the concentration ratio of guaifenesin to the D3-guaifenesin in plasma

### Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация веществ в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение веществ со значениями RSD и E не более 20 %.

Нижний предел количественного определения методики составил 0,10 нг/мл для сальбутамола, 0,25 нг/мл для бромгексина, 0,075 нг/мл для амброксола, 10,00 нг/мл для гвайфенезина. Хромограмма плазмы крови с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО приведена на рисунке 11.

Отношение сигнал/шум по пикам исследуемых веществ на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения LabSolutions не превышает 10,8.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

**Таблица 7.** Точность и прецизионность методики (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

**Table 7.** Accuracy and precision (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

| Введено<br>(нг/мл) | Найдено (нг/мл),<br>среднее значение |          |          | SD      |          |          | RSD, %  |          |          | E, %    |          |          |
|--------------------|--------------------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
|                    | (n = 5)                              | (n = 10) | (n = 15) | (n = 5) | (n = 10) | (n = 15) | (n = 5) | (n = 10) | (n = 15) | (n = 5) | (n = 10) | (n = 15) |
| <i>Сальбутамол</i> |                                      |          |          |         |          |          |         |          |          |         |          |          |
| 0,10               | 0,10                                 | 0,10     | 0,10     | 0,01    | 0,01     | 0,01     | 13,88   | 10,42    | 5,96     | 1,80    | 3,50     | 4,27     |
| 0,50               | 0,47                                 | 0,49     | 0,49     | 0,03    | 0,02     | 0,01     | 5,62    | 4,82     | 1,56     | -5,36   | -2,58    | -1,60    |
| 10,00              | 9,57                                 | 10,06    | 9,76     | 0,53    | 0,66     | 0,40     | 5,50    | 6,60     | 4,05     | -4,35   | 0,61     | -2,39    |
| 20,00              | 19,36                                | 19,55    | 19,36    | 0,92    | 0,70     | 0,74     | 4,76    | 3,60     | 3,83     | -3,22   | -2,23    | -3,23    |
| <i>Бромгексин</i>  |                                      |          |          |         |          |          |         |          |          |         |          |          |
| 0,25               | 0,27                                 | 0,26     | 0,26     | 0,02    | 0,02     | 0,01     | 9,21    | 7,52     | 2,18     | 8,00    | 4,56     | 3,23     |
| 1,00               | 0,92                                 | 0,95     | 0,96     | 0,04    | 0,05     | 0,05     | 4,43    | 4,89     | 5,58     | -7,56   | -5,36    | -4,23    |
| 20,00              | 18,85                                | 18,87    | 19,08    | 0,47    | 0,53     | 0,67     | 2,51    | 2,80     | 3,49     | -5,76   | -5,64    | -4,59    |
| 25,00              | 21,47                                | 22,22    | 23,00    | 0,57    | 1,33     | 0,37     | 2,64    | 6,01     | 1,61     | -14,14  | -11,11   | -8,00    |
| <i>Амброксол</i>   |                                      |          |          |         |          |          |         |          |          |         |          |          |
| 0,075              | 0,073                                | 0,074    | 0,074    | 0,01    | 0,00     | 0,00     | 7,74    | 5,71     | 3,38     | -2,13   | -1,60    | -1,24    |
| 0,25               | 0,23                                 | 0,24     | 0,25     | 0,01    | 0,01     | 0,01     | 3,04    | 4,54     | 2,73     | -6,56   | -3,12    | -1,92    |
| 2,00               | 2,01                                 | 1,99     | 2,01     | 0,06    | 0,07     | 0,06     | 2,84    | 3,27     | 2,95     | 0,32    | -0,31    | 0,50     |
| 3,00               | 2,78                                 | 2,83     | 2,86     | 0,16    | 0,18     | 0,07     | 5,67    | 6,52     | 2,60     | -7,51   | -5,52    | -4,53    |
| <i>Гвайфенезин</i> |                                      |          |          |         |          |          |         |          |          |         |          |          |
| 10,00              | 10,87                                | 10,37    | 10,32    | 0,071   | 0,87     | 0,48     | 6,57    | 8,35     | 4,63     | 8,71    | 3,74     | 3,22     |
| 50,00              | 51,99                                | 50,86    | 51,09    | 1,76    | 1,75     | 1,39     | 3,39    | 3,45     | 2,73     | 3,97    | 1,72     | 2,17     |
| 1000,00            | 1013,28                              | 1022,64  | 952,98   | 65,06   | 50,04    | 378,97   | 6,42    | 4,89     | 39,77    | 1,33    | 2,26     | -4,70    |
| 2000,00            | 1982,52                              | 1940,95  | 1870,99  | 97,04   | 97,40    | 366,51   | 4,89    | 5,02     | 19,59    | -0,87   | -2,95    | -6,45    |

Sample Name : cal\_1\_1  
Month-Day Acquired : 16.10.2018  
Time Acquired : 18:23:43  
Sample Type : Standard  
Injection Volume : 10  
Method File : ascoril\_quant1.mrm.lcm

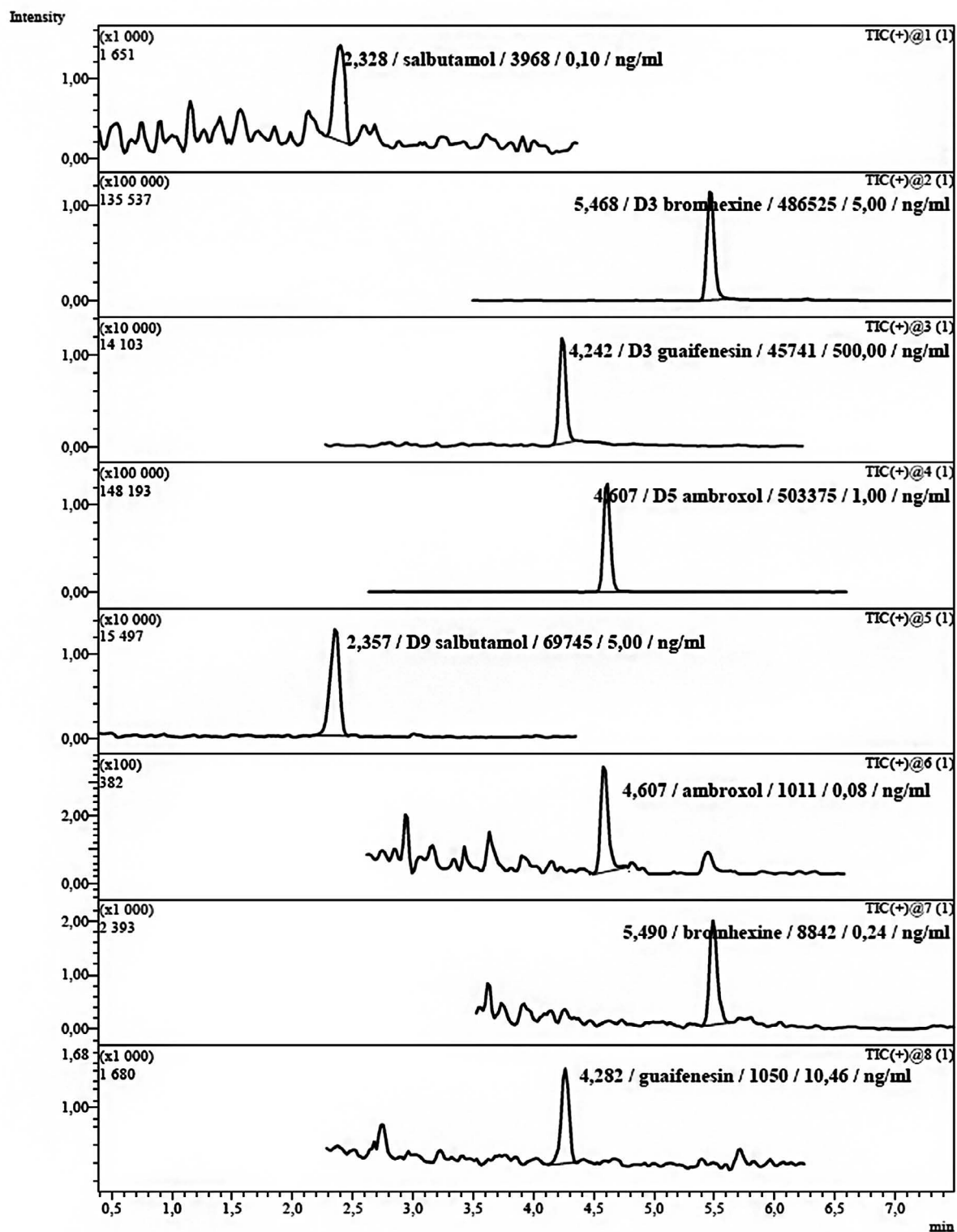


Рисунок 11. Хроматограмма образца с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО

Figure 11. Chromatogram of the sample with the content of the studied substances at the level LLOQ

## Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 60 дней при температуре  $-45^{\circ}\text{C}$ ), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре  $-45^{\circ}\text{C}$ ) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

## Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и внутренним стандартам, с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения сальбутамола, бромгексина, амброксола и гвайфенезина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,10–20,00 нг/мл в плазме крови для сальбутамола, 0,25–25,00 нг/мл в плазме крови для бромгексина, 0,075–3,00 нг/мл в плазме крови для амброксола и 10,00–2000,00 нг/мл в плазме крови для гвайфенезина. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих сальбутамол, бромгексин, амброксол, гвайфенезин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09019>; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01001>; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00874>; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06742>.
2. Регистр лекарственных средств. Available at: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_1338.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1338.htm); [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_276.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_276.htm); [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_175.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_175.htm); [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_2287.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2287.htm).
3. Schmeer, K., Sauter, T., Schmid J. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1997; 777(1): 67–72. Doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00432-9.
4. Joyce K. B., Jones A. E., Scott R. J., Biddlecombe R. A., Pleasance S. Determination of the enantiomers of salbutamol and its 4-O-sulphate metabolites in biological matrices by chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 1998; 12(23): 1899–1910. Doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981215)12:23<1899::AID-RCM417>3.0.CO;2-II.
5. Liu J., Chen X., Hu Y., Cheng G., Zhong D. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC–MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010; 51(5): 1134–1141. Doi.org/10.1016/j.jpba.2009.11.024.

6. Kim H., Yoo J. Y., Han S. B., Lee H. J., Lee K. R. Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. (2003); 32(2): 209–216. Ddoi.org/10.1016/S0731-7085(03)00059-1.
7. Wen A., Hang T., Chen S., Wang Z., Ding L., Tian, Y., Xu X. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC–MS/MS: Validation and application to pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2008; 48(3): 829–834. Doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.032.
8. Su F., Wang F., Gao W., Li H. Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI). *Journal of Chromatography B*. 2007; 853(1-2): 364–368. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.015.
9. Hang T. J., Zhang M., Song M., Shen J. P. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS/MS. *Clinica chimica acta*. (2007); 382(1-2): 20–24. Doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.015.
10. Dong X., Ding L., Cao X., Jiang L., Zhong S. A sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma with segmental monitoring. *Biomedical Chromatography*. (2013); 27(4): 520–526. Doi.org/10.1002/bmc.2824.
11. Eichhold T. H., McCauley-Myers D. L., Khambhe D. A., Thompson, G. A., Hoke S. H. (II). Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrophan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007; 43(2): 586–600. Doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.018.
12. Wen J., Zhang H., Xia C., Hu X., Xu W., Cheng X., Xiong Y. A sensitive liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry method for the simultaneous determination of pentoxifyverine citrate and guaifenesin in human plasma – application to pharmacokinetic and bioequivalence studies. *Biomedical chromatography*. 2010; 24(4): 351–357. Doi.org/10.1002/bmc.1298.
13. Chen X., Huang J., Kong Z., Zhong D. Sensitive liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005; 817(2): 263–269. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.011.
14. Pubchem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2083#section=Solubility>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2442#section=Chemical-and-Physical-Properties>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2132#section=Experimental-Properties>.
15. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: *Гриф и К*. 2013: 280.
16. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
17. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.

## REFERENCES

1. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09019>; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01001>; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00874>; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06742>.
2. Register of medicines. Available at: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_1338.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1338.htm); [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_276.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_276.htm); [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_175.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_175.htm); [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_2287.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2287.htm).
3. Schmeer, K., Sauter, T., Schmid J. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1997; 777(1): 67–72. Doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00432-9.
4. Joyce K. B., Jones A. E., Scott R. J., Biddlecombe R. A., Pleasance S. Determination of the enantiomers of salbutamol and its 4-O-sulphate metabolites in biological matrices by chiral liquid

- chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 1998; 12(23): 1899–1910. Doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981215)12:23<1899::AID-RCM417>3.0.CO;2-I/.
5. Liu J., Chen X., Hu Y., Cheng G., Zhong D. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC-MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010; 51(5): 1134–1141. Doi.org/10.1016/j.jpba.2009.11.024.
  6. Kim H., Yoo J. Y., Han S. B., Lee H. J., Lee K. R. Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. (2003); 32(2): 209–216. Ddoi.org/10.1016/S0731-7085(03)00059-1.
  7. Wen A., Hang T., Chen S., Wang Z., Ding L., Tian, Y., Xu X. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC-MS/MS: Validation and application to pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2008; 48(3): 829–834. Doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.032.
  8. Su F., Wang F., Gao W., Li H. Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *Journal of Chromatography B*. 2007; 853(1-2): 364–368. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.015.
  9. Hang T. J., Zhang M., Song M., Shen J. P. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS/MS. *Clinica chimica acta*. (2007); 382(1-2): 20–24. Doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.015.
  10. Dong X., Ding L., Cao X., Jiang L., Zhong S. A sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma with segmental monitoring. *Biomedical Chromatography*. (2013); 27(4): 520–526. Doi.org/10.1002/bmc.2824.
  11. Eichhold T. H., McCauley-Myers D. L., Khambe D. A., Thompson, G. A., Hoke S. H. (II). Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrophan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007; 43(2): 586–600. Doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.018.
  12. Wen J., Zhang H., Xia C., Hu X., Xu W., Cheng X., Xiong Y. A sensitive liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry method for the simultaneous determination of pentoxifyverine citrate and guaifenesin in human plasma – application to pharmacokinetic and bioequivalence studies. *Biomedical chromatography*. 2010; 24(4): 351–357. Doi.org/10.1002/bmc.1298.
  13. Chen X., Huang J., Kong Z., Zhong D. Sensitive liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005; 817(2): 263–269. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.011.
  14. Pubchem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2083#section=Solubility>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2442#section=Chemical-and-Physical-Properties>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2132#section=Experimental-Properties>.
  15. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. M.: Grief and K. 2013: 280.
  16. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
  17. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.



# АНАЛИТИКА ЭКСПО

18-я Международная выставка  
лабораторного оборудования  
и химических реактивов

**21–24.04.2020**

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»



[analitikaexpo.com](http://analitikaexpo.com)

**Забронируйте стенд**

Организатор



Соорганизаторы



Ассоциация Аналитических Центров



## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науки:

- 02.00.00 – химические науки;
- 03.02.00 – общая биология;
- 03.03.00 – физиология;
- 14.04.00 – фармацевтические науки.

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборки и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

### УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал предоставляет приоритет для аспирантских и докторских работ, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате \*.pdf или \*.jpg).

### ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае не-

соответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

### ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте [www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org)

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

### ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (\*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

**Перечень документов**, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

### 1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

### 2. РУКОПИСЬ

#### РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

#### Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией

#### Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

**Введение** (введение работы в сжатой форме).

**Цель** (цель работы в сжатой форме).

**Материалы и методы** (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

**Результаты** (основные результаты исследования).

**Заключение** (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

**Введение** (введение работы в сжатой форме).

**Текст** (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

**Заключение** (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

**Ключевые слова:** (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах и не повторять название статьи.

#### АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

##### Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

##### Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

##### Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

##### Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

#### ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

##### Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

##### Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств ([grls.rosminzdrav.ru](http://grls.rosminzdrav.ru)). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру вы-

данных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: Синдрол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производитель, страну происхождения [Пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете в прослеживаемом формате, с четкими разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т.д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например:  $\bar{M}$  – выборочное среднее;  $m$  – ошибка среднего;  $\sigma$  – стандартное квадратичное отклонение;  $p$  – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа  $M \pm m$ , указать объем выборки  $n$ . Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариативности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости  $p$  для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами, и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т.п.).

#### Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

#### Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

##### Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

##### Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования, как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

##### Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

##### Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

#### ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

**Не следует ссылаться:** на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

**Следует избегать** ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных, должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

**Недопустимо самоцитирование**, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (in Russ.). Приводится английское название журнала (название сверяется с официальным сайтом издания) через тире после транслитерации названия и оформляется курсивом.

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.
5. В конце описания в круглых скобках указывается (in Russ.).

*Образец оформления списка литературы*

#### **Литература/References**

1. Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева, 2015:272 [Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. Introduction to psychopharmacogenetics. St.-Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva, 2015:272 (in Russ.).]
2. Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013; 15 (1):20–23 [Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer] *Onkologiya – Oncology*. 2013; 15(1): 20–23 (in Russ.).]
3. Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008; 7 (1): 58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.
4. Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008; 29 (7): 777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

**В библиографическом описании** каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства, либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Не допустимо сокращать название статьи.

**Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций**

#### **Монографии**

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

#### **Образец оформления**

*Для русскоязычных источников*

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009:328 [Sokolova G. N., Potapova V. B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009:328 (in Russ.).]

*Для англоязычных источников*

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press, 2005: 194.

*Статья из журнала*

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название ста-

тьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

#### **Образец оформления**

*Для русскоязычных источников*

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014; 13 (3): 53–57 [Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014; 13 (3): 53–57 (in Russ.).]

*Для англоязычных источников*

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L. B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006; 113 (4): 306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

**Варианты библиографического описания материалов конференций:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

**Варианты библиографического описания патентов:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

**Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>  
**DOI**

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

#### **ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ**

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

#### **Таблицы**

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ \*. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

#### **Рисунки**

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

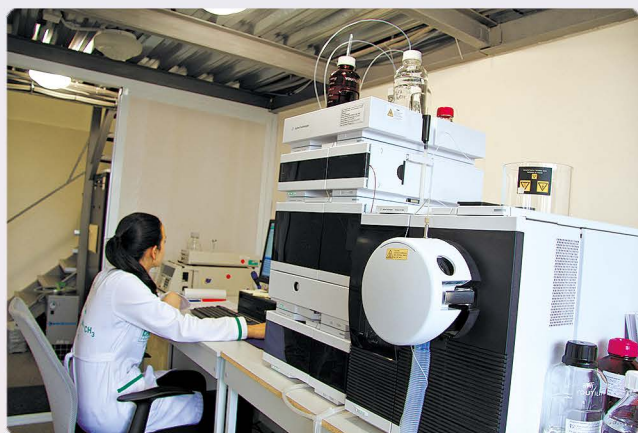
Каждый рисунок должен сопровождаться подписочной подписью на русском и английском языках. В подписочных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подписочных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате \*.tif, \*.jpg, \*.cdr, \*.ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.



## Расписание обучающих мероприятий в Центре Фармацевтической Аналитики на период сентябрь-декабрь 2019 г.

| № | Название курса                                                                                                 | Даты проведения | Стоимость             |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств                                            | 10–11 октября   | 14 900 руб./слушатель |
| 2 | Разработка, валидация и применение хроматографических методик анализа в контроле качества ЛС: базовый курс     | 24–25 октября   | 14 900 руб./слушатель |
| 3 | Разработка, валидация и применение хроматографических методик анализа в контроле качества ЛС: продвинутый курс | 7–8 ноября      | 14 900 руб./слушатель |
| 4 | Исследования фармакокинетики и биоэквивалентности: надлежащая и ненадлежащая практика                          | 28–29 ноября    | 14 900 руб./слушатель |
| 5 | СМК и GLP в исследовательских лабораториях: внедрение и реализация на практике                                 | 12–13 декабря   | 14 900 руб./слушатель |

Скидки при заказе трех и более разных курсов: 30%.

Стоимость выездного семинара по любой из указанных тем у Вас на предприятии стоимость обучения составляет **99 000 руб./группа\***.

Для участия в семинаре необходимо прислать в свободной форме заявку на адрес [info@cpha.ru](mailto:info@cpha.ru).

\*Стоимость проезда, проживания и командировочные расходы при проведении выездного семинара за пределами Москвы оплачивается отдельно.



Курс читает генеральный директор ООО "ЦФА" доктор фармацевтических наук **Шохин Игорь Евгеньевич**.

Главный редактор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Ведущий переводчик и научный редактор русского издания Европейско Фармакопеи.

Председатель оргкомитета цикла конференций «Исследования кинетики растворения, фармакокинетики и биоэквивалентности».

Автор монографии «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств».

**Место проведения:** г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2,  
АО «Технопарк «Слава»

Тел.: +7 (499) 281-81-11 [info@cpha.ru](mailto:info@cpha.ru) [www.cpha.ru](http://www.cpha.ru)

**Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:**

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммуотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

## МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

[WWW.OLPHARM.RU](http://WWW.OLPHARM.RU)

### Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри



### Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10  
от 08.10.2014

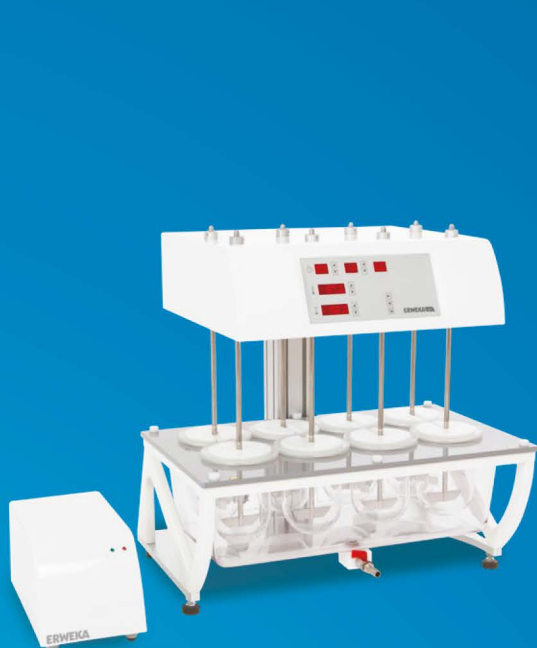
Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09  
от 30.04.2009 на выполнение работ с  
микроорганизмами 3–4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»  
117105, Г. МОСКВА,  
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А  
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36  
E-MAIL: [INFO@OLPHARM.RU](mailto:INFO@OLPHARM.RU)

# Серия тестеров растворения

# ERWEKA DT light

Экономичные тестеры с ручным отбором проб



**DT 128 light**  
8 станций



**DT 126 light**  
6 станций

**DT 1212 light**  
12 станций

