

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ



RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION



**Создание
лабораторий под ключ**

develop@chimmed.ru

Стр. 21





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) химико-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 СТКР (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.; 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. В связи с Решением Руководства Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» №026-4-4857-7224.21 от 05.09.2021 действие сертификатов соответствия СМК требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015 №18.1497.026 и ISO 9001:2015 №18.1498.026 продлено на срок до 31.12.2021 г.



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2021. Том 10, № 4

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2021. Volume 10, 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 раздел – 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 методик, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в ГхР-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.

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Белобородов В. Л., к. фарм. н., профессор кафедры химии Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, 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

Ваизова О. Е., доцент, д. м. н., профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Вартаньянц И. А., проф., к. ф.-м. н., профессор Deutsches Elektronen-Synchrotron, Гамбург, Германия

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

Ивкин Д. Ю., к. б. н., доцент, начальник центра экспериментальной фармакологии, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

Каленикова Е. И., проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Комаров Т. Н., к. фарм. н., заведующий лабораторией биоаналитических исследований № 2, ООО «ЦФА», Москва, Россия

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

Куркин В. А., д. фарм. н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, 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 НЦЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Мирошник И. И., д. м. н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия

Оборотова Н. А., проф., д. фарм. н., 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

Селезнева А. И., к. м. н., заместитель начальника управления по исследованиям и развитию ФБУ «ГИЛС и НП», Москва, Россия

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

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 Иванэ Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

Сысцев Б. Б., доц., д. фарм. н., 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.
Основан	Журнал издается с ноября 2012 г.
Периодичность	4 выпуска в год
Префикс DOI	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Адрес редакции	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Адрес типографии	ООО «МАКС ПРЕСС» Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
Копирайт	© Разработка и регистрация лекарственных средств, 2021
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
Тираж	999 экземпляров
Цена	Свободная

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

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 section 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.

Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC Center of Pharmaceutical Analytics/LLC "CPHA"), Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Editorial board

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

Vladimir L. Beloborodov, Dr. of Sci., Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, 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

Olga E. Vaizova, as. Prof., Dr. of Sci., Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Ivan A. Vartanants, Prof., Cand. of Sci, Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany

Konstantin S. Guzev, Retinoidy 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

Dmitry Yu. Ivkin, Cand. of Sci, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Elena I. Kalenikova, Prof., Dr. of Sci., Lomonosov Moscow State 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

Vladimir A. Kurkin, Dr. of Sci., Samara State Medical University, Samara, 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.), FSBI "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Igor I. Miroshnichenko, Dr. of Sci., Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Center of Mental Health", Moscow, Russia

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

Arina I. Selezneva, Cand. of Sci., State Institute of Drugs and Good Practices, Moscow, Russia

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

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

Olga 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	LC 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	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Publisher	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
Founded:	The journal has been published since November 2012.
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Editorial office address	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	LLC "MAX PRESS" 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, 2021
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License 
Circulation	999 copies
Price	Free

The journal is included in the List of peer-reviewed scientific publications, in which the main scientific results of dissertations for the degree of candidate of science, for the degree of doctor of sciences should be published

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции	10
Мероприятия	23
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Изучение физико-химических свойств субстанции этравирина С. А. Золотов, Е. С. Пономарев, И. А. Даин, Н. Б. Демина, А. С. Золотова	28
Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного О. Л. Сайбель, А. И. Радимич, Т. Д. Даргаева, И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, И. А. Мартыничик	36
Антиоксидантная активность серебросодержащих бионаноконпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток Е. Е. Буйко, М. В. Зыкова, В. В. Иванов, К. А. Братишко, А. А. Уфандеев, И. О. Григорьева, А. В. Цупко, Д. А. Михалёв, И. В. Перминова, М. В. Белоусов	46
Фармацевтическая технология	
Интраназальные системы доставки <i>in situ</i>: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор) Е. О. Бахрушина, Н. Б. Демина, М. М. Шумкова, П. С. Родюк, Д. С. Шуликина, И. И. Краснюк	54
Исследование физико-химических характеристик цеолитов Холинского месторождения А. В. Бондарев, Е. Т. Жиликова, Н. Б. Демина, К. К. Размахнин	65
Основы разработки микроволновой интенсификации <i>upstream process</i> на примере <i>Escherichia coli</i> Д. Б. Кузнецов, А. Ю. Миронов, В. А. Несчислаев, И. Л. Вольхин, А. М. Королюк, Е. В. Орлова, А. Д. Шилина	72
Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в составе конъюгата полимерных частиц с белковой векторной молекулой М. Б. Сокол, Н. Г. Яббаров, М. Р. Моллаева, М. В. Чиркина (Фомичева), В. Ю. Балабаньян, Е. Д. Никольская	81
Оптимизация состава мази с фитоэкдистероидами серпистена Е. И. Молохова, Ю. В. Сорокина, Д. Е. Липин	89
Применение ультразвука в экстракции биологически активных соединений из растительного сырья, применяемого или перспективного для применения в медицине (обзор) А. А. Елапов, Н. Н. Кузнецов, А. И. Марахова	96
Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор) Н. Н. Порфирьева, И. И. Семина, Р. И. Мустафин, В. В. Хуторянский	117
Исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С А. А. Дранников, И. С. Ватлин, М. Е. Трусова, А. Ди Мартино, С. В. Кривошеков, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов	129
Методы анализа лекарственных средств	
Количественные анатомические характеристики листовых пластинок некоторых видов <i>Crataegus</i> L. В. А. Сагарадзе, Е. Ю. Бабаева, Е. И. Каленикова, Н. А. Трусов, Е. В. Пещанская	138
Особенности накопления восстанавливающих сахаров цветками липы сердцевидной (<i>Tilia cordata</i> Miller, 1768) в Воронежской области Н. А. Дьякова, А. И. Сливкин, С. П. Гапонов, Е. А. Бобина, Л. А. Шишорина	147
Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии А. В. Марухленко, Т. В. Максимова, Т. В. Плетенева, М. А. Морозова	154

Доклинические и клинические исследования

Модулирование противогрибковой активности антимикотических препаратов с помощью фарнезола

Н. П. Сачивкина, А. Н. Сенягин, И. В. Подопригора, Д. Г. Браун, В. В. Виссарионова 162

Ретроспективный анализ экспериментального и клинического изучения флакозида при вирусных гепатитах

В. В. Карабаева, Л. В. Крепкова, А. Н. Бабенко, В. В. Бортникова, Т. В. Фатеева, П. Г. Мизина, Н. С. Михеева, О. Н. Карабаева 169

Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, А. В. Алешина, Н. С. Багаева, П. А. Карпова, И. Е. Шохин 177

Регуляторные вопросы

Применение цифровых технологий для целей совершенствования методических подходов к созданию фармацевтической системы качества на предприятиях по выпуску лекарственных средств

В. В. Горячкин, В. А. Смирнов, В. Н. Шестаков, Р. А. Абрамович 191

Альтернативные методы расчета сопоставимости профилей растворения при проведении теста сравнительной кинетики растворения

Д. П. Ромодановский, Д. В. Горячев 197

Исправления

Исправления к статье: «Разработка, валидация и применение методики количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа лекарственных средств и биологически активных добавок к пище»

И. Е. Шохин, Е. А. Малашенко, Ю. В. Медведев, М. Н. Богачук, С. А. Кулаков, М. А. Палеева 208

CONTENTS

Introduction	10
Events	23
Research and development of new drug products	
Study of the Physicochemical Properties of the Etravirine Substance Sergey A. Zolotov, Evgenii S. Ponomarev, Igor A. Dain, Natalia B. Demina, Anna S. Zolotova	28
Phenolic Compounds and Hepatoprotective Activity of Chicory Herb Extract Olga L. Saybel, Andrey I. Radimich, Tamara D. Dargaeva, Irina A. Lupanova, Ekaterina V. Ferubko, Elena N. Kurmanova, Irina A. Martynchik	36
Antioxidant Activity of Silver-containing Bionanocompositions Based on Humic Substances in Cell Culture Evgeny E. Buyko, Maria V. Zykova, Vladimir V. Ivanov, Kristina A. Bratishko, Alexander A. Ufandeev, Irina O. Grigorieva, Andrey V. Tsupko, Dmitry A. Mikhalyov, Irina V. Perminova, Mikhail V. Belousov	46
Pharmaceutical Technology	
In situ Intranasal Delivery Systems: Application Prospects and Main Pharmaceutical Aspects of Development (Review) Elena O. Bakhrushina, Natalia B. Demina, Marina M. Shumkova, Polina S. Rodyuk, Daria S. Shulikina, Ivan I. Krasnyuk	54
Investigation of the Physical and Chemical Characteristics of the Zeolites of the Kholinsky Deposit Alexander V. Bondarev, Elena T. Zhilyakova, Natalya B. Demina, Konstantin K. Razmakhnin	65
Basics of the Development of Microwave Intensification of Upstream on the Example of <i>Escherichia coli</i> Denis B. Kuznetsov, Andrey Yu. Mironov, Valery A. Neschislyayev, Igor L. Volkhin, Alexander M. Korolyuk, Ekaterina V. Orlova, Anastasiya D. Shilina	72
Development of the Composition and Technology for Obtaining Paclitaxel Nanoscale Formulation Consisting of a Conjugate of Polymer Particles with a Protein Vector Molecule Maria B. Sokol, Nikita G. Yabbarov, Mariia R. Mollaeva, Margarita V. Chirkina (Fomicheva), Vadim Yu. Balaban'yan, Elena D. Nikolskaya	81
Optimization of the Composition of the Ointment with Phytoecdysteroids Serpisten Elena I. Molokhova, Yuliya V. Sorokina, Daniil E. Lipin	89
The Use of Ultrasound in the Extraction of Biologically Active Compounds from Plant Raw Materials, Used or promising for Use in Medicine (Review) Alexander A. Elapov, Nikolay N. Kuznetsov, Anna I. Marakhova	96
Intranasal Administration as a Route to Deliver Drugs to the Brain (Review) Natalia N. Porfiryeva, Irina I. Semina, Rouslan I. Moustafine, Vitaliy V. Khutoryanskiy	117
Investigation of Colloidal Structure and Biopharmaceutical Properties of New Antibacterial Composition of Gramicidin S Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin, Marina E. Trusova, Antonio Di Martino, Sergei V. Krivoshechekov, Artem M. Guriev, Mikhail V. Belousov	129
Analytical Methods	
Quantitative Anatomical Characteristics of the Leaf Blades of the Several Species of <i>Crataegus</i> L. Valentina A. Sagaradze, Elena Yu. Babaeva, Elena I. Kalenikova, Nikolay A. Trusov, Ekaterina V. Peshchanskaya	138
Accumulation of Reducing Sugars by Small-leaved Linden Flowers (<i>Tilia cordata</i> Miller, 1768) in the Voronezh Region of Russia Nina A. Dyakova, Alexey I. Slivkin, Sergey P. Gaponov, Elizaveta A. Bobina, Lilia A. Shishorina	147
Development and Validation of Method for the Quantitative Determination of Zinc in its Chelate Complexes Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectroscopy Alla V. Marukhlenko, Tatyana V. Maksimova, Tatyana V. Pleteneva, Mariya A. Morozova	154

Preclinical and clinical study

Modulating the Antifungal Activity of Antimycotic Drugs with Farnesol

Nadezhda P. Sachivkina, Alexander N. Senyagin, Irina V. Podoprighora, Dana G. Brown,
Vera V. Vissarionova 162

Retrospective Analysis of Experimental and Clinical Studies of Flakozid in Viral Hepatitis

Vera. V. Karabaeva, Lubov' V. Krepkova, Aleksandra N. Babenko, Valentina V. Bortnikova, Tatyana V. Fateeva,
Praskovya G. Mizina, Natalya S. Mikheeva, Ol'ga N. Karabaeva 169

Simultaneous Determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Polina K. Karnakova, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva,
Alexandra A. Aleshina, Natalia S. Bagaeva, Polina A. Karpova, Igor E. Shohin 177

Regulatory Issues

The Use of Digital Technologies for the Purpose of Improving Methodological Approaches to the Creation of a Pharmaceutical Quality System at Enterprises for the Production of Medicines

Vyacheslav V. Goryachkin, Vladimir A. Smirnov, Vladislav N. Shestakov, Rimma A. Abramovich 191

Alternative Methods for Dissolution Profile Comparison in the Dissolution Test

Dmitry P. Romodanovsky, Dmitry V. Goryachev 197

Erratums

Erratum: "HPLC-UV Method Development and Validation for Vitamin D₃ (Cholecalciferol) Quantitation in Drugs and Dietary Supplements"

Igor E. Shohin, Evgeniya A. Malashenko, Yuri V. Medvedev, Maria N. Bogachuk, Stanislav A. Kulakov,
Maria A. Paleeva 208

Приглашаем принять участие в научно-практической конференции

**ЕЖЕГОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ:
ПРИМЕНЕНИЕ ПРАВИЛ GLP ЕАЭС»**

Конференция состоится 17 декабря 2021 года в онлайн-формате

Уважаемые читатели!

В этот раз мы поговорим о применении принципов GLP в соответствии с требованиями ЕАЭС при проведении исследований лекарственных средств. Обсудим особенности планирования ДКИ и КИ биотехнологических лекарственных средств, а также разберем практические кейсы на примере исследовательских и производственных лабораторий.

Организаторами конференции выступают **ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»** и научно-производственный журнал **«Разработка и Регистрация лекарственных средств»**. В этом году мероприятие проводится совместно со Статэндокс Академией. Конференция состоится 17 декабря 2021 г. в онлайн-формате.

Место проведения: онлайн

Дата: 17 декабря 2021 г.

Стоимость для слушателей: бесплатно

Контакты организаторов: info@pharmjournal.ru

По вопросам спонсорского участия: Наталья, pharmjournalru@gmail.com

Лекторы конференции: доктора и кандидаты наук, сотрудники научных учреждений и ВУЗов, лабораторных центров, производителей оборудования, производителей биотехнологических лекарственных средств.

Аудитория: сотрудники отделов разработки ЛС фарм-предприятий; сотрудники отделов регистрации фармацевтических компаний; сотрудники контрактно-исследовательских организаций; сотрудники научных и образовательных учреждений.

В программе конференции:

1. GLP по ЕАЭС – применение требований решения 81 ЕЭК в исследованиях лекарственных средств.
2. СМК в доклинических и клинических исследованиях.

3. Планирование ДКИ биотехнологических ЛС.

4. Планирование КИ биотехнологических ЛС.

5. Надлежащая и ненадлежащая практика работы био-аналитической лаборатории.

6. Установление *in vitro* – *in vivo* корреляции при разработке ЛС с модифицированным высвобождением.

7. Многие другие темы

Точная программа конференции будет доступна на сайте организаторов pharmjournal.ru.

Для получения программы по электронной почте необходимо подписаться на **рассылку журнала**

<https://www.pharmjournal.ru/jour/pages/view/subs>

Для посещения мероприятия зарегистрируйтесь по QR-код.

**Генеральный
информационный партнер**

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**



Спонсор

ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики



Зарегистрироваться



При поддержке

ERWEKA



АВРОРА
ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ



Рекламная статья / Sponsored article



Использование 2D экспериментов с обратной гетероядерной корреляцией на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse для исследования строения гемфиброзила

Статья предоставлена компанией ООО «АВРОПА»

В статье рассмотрено применение двух мощных техник ЯМР ME-HSQC и HMBC для определения строения молекул на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse на примере молекулы гемфиброзила. Полученные результаты дают основания утверждать, что применение настольного спектрометра X-Pulse позволяет получить надежные результаты за короткое время.

Using 2D experiments with reverse heteronuclear correlation on a benchtop NMR spectrometer X-Pulse to study the structure of gemfibrozil

The article is presented by the company LLC "AVRORA"

The article discusses application of two powerful NMR techniques ME-HSQC and HMBC to determine the structure of gemfibrozil molecules as an example on the benchtop NMR spectrometer X-Pulse. The obtained results give grounds to assert that the use of the benchtop X-Pulse NMR spectrometer allows obtaining reliable results in a short time.

Метод ядерного магнитного резонанса широко применяется в синтетической химии для исследования строения молекул. Широкое применение он нашел и в фармацевтической индустрии, как метод исследования строения фармацевтических субстанций и определения примесей, ОФС.1.2.1.1.0007.15 и ОФС.1.7.2.0014.15. В настоящее время в области ЯМР-риборостроения активно развивается направление настольных ЯМР-спектрометров с редкоземельными магнитами^{1,2,3}. Спектр решаемых задач настольными приборами постоянно расширяется с ростом их характеристик.

¹ Pagès G., Gerdova A., Williamson D., Gilard V., Martino R., Malet-Martino M. Evaluation of a Benchtop Cryogen-Free Low-Field 1H NMR Spectrometer for the Analysis of Sexual Enhancement and Weight Loss Dietary Supplements Adulterated with Pharmaceutical Substances. *ACS Analytical Chemistry*. 2014;86(23):11897–11904.

² Калабин Г. А., Васильев В. Г., Ивлев В. А., Комаров Н. А., Абрамович Р. А. Быстрый скрининг лекарственных средств без стандартных образцов: ренессанс низкочастотных спектрометров ЯМР. *Аналитика*. 2017;6:44–50.

³ Gerdova A., Defomez M., Jakes W., Limer E., McCallum C., Nott K., Parker T., Rigby N., Sagidullin A., Watson A. D., Williamson D., Kemsley E. K. Magnetic Resonance in Food Science: Defending Food by Magnetic Resonance. In: Royal Society of Chemistry. 2015. 223 p.

Одним из значительных достижений в области ЯМР с момента его создания стало внедрение 2-мерных (2D) ЯМР-экспериментов. Их использование значительно повысило мощность метода ЯМР для подтверждения строения молекул, расширило круг и сложность решаемых проблем^{4,5,6}.

Данные эксперименты представляют собой серию одномерных (1D) экспериментов, отличающихся лишь шагом по времени, который вводится через последовательность импульсов. В результате

⁴ Caprio V., McLachlan A. S., Sutcliffe O. B., Williamson D. C., Mewis R. E. Structural Elucidation of Unknowns: A Spectroscopic Investigation with an Emphasis on 1D and 2D 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*. 2018;27(2):223–234.

⁵ Fallaise D., Tweedie H. B., Konzuk J., Cheyne C., Mack E. E., Longstaffe J. G. Practical application of 1 H benchtop NMR spectroscopy for the characterization of a nonaqueous phase liquid from a contaminated environment. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2019;57(2–3):93–100.

⁶ Antonides L. H., Brignall R. M., Costello A., Ellison J., Firth S. E., Gilbert N., Groom B. J., Hudson S. J., Hulme M. C., Marron J., Pullen Z. A., Robertson T. B. R., Schofield C. J., Williamson D. C., Kemsley E. K., Sutcliffe O. B., Mewis R. E. Rapid Identification of Novel Psychoactive and Other Controlled Substances Using Low-Field 1H NMR Spectroscopy. *ACS Omega*. 2019;4(4):7103–7112.

получается двумерный массив данных с двумя отдельными временными изменениями – прямым измерением (t_2) и непрямым (t_1) измерением. В результате двумерного дискретного преобразования Фурье получается двумерный спектр с двумя осями F1 и F2, по которым отложено значение частоты. Эксперименты по двумерной гетероядерной корреляции широко применяются в ЯМР при работе на спектрометрах с сильным полем. Представляется важным, чтобы данная мощная практика нашла широкое применение среди настольных ЯМР-спектрометров 60 МГц с постоянными магнитами, которые значительно дешевле и проще в обслуживании и эксплуатации. И которые с успехом применяются для решения широкого спектра задач по исследованию строения молекул.

Эксперименты с гетероядерными корреляциями позволяют определять взаимосвязь между сигналами протона и углерода через спин-спиновое взаимодействие и используются для определения строения неизвестного соединения.

В данной статье рассмотрены результаты двух таких экспериментов, ME-HSQC и HMBC¹. Эти эксперименты часто описываются как обратные эксперименты, поскольку сигналы от протона измеряются напрямую, а сигнал от ядра X (например, ^{13}C или любого другого X) – через протонный канал прибора для максимизации чувствительности экспериментов. Это позволяет выполнять гетероядерные корреляции намного быстрее, чем в обычном эксперименте HETCOR [7] и сокращает необходимое время с нескольких часов до десятков минут. В статье рассмотрены результаты экспериментов ME-HSQC и HMBC 1 М раствора гемфиброзила (рисунок 1), лекарственного препарата, используемого для лечения аномальных уровней содержания липидов в крови.

Метод ME-HSQC позволяет установить прямую связь спектров, полученных на протоне и на углероде. Сигнал от протона может коррелировать с сигналом от углерода, с которым он непосредственно химически связан. В спектре HSQC данная корреляция проявляется как перекрестные пики (пики, появляющиеся как в протонном, так и в углеродном спектре). Сигналы в 1D углеродном спектре, не имеющие перекрестных пиков, относятся к сигналам четвертичных атомов углерода.

Популярным дополнением к базовому эксперименту HSQC является эксперимент с, так называемой, коррективкой по мультиплетности (ME), иногда называемый откорректированным по DEPT [7], так как результат очень похож на результат эксперимента DEPT-135, только в двумерном варианте. Ана-

¹ Claridge T.D.W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Volume 2. 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier Science. 2008. 398 с.

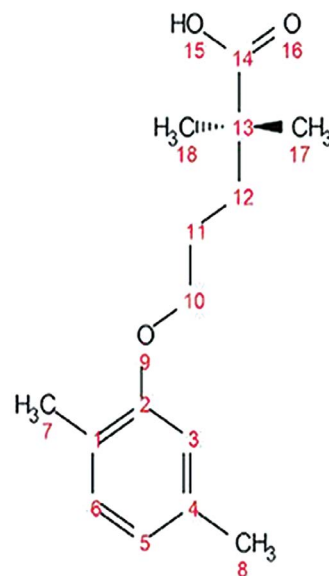


Рисунок 1. Спектр HMBC для 1 М раствора гемфиброзила. 16 сканирований с общим временем эксперимента 1 час 40 минут. Спектр получен на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse

Figure 1. HMBC spectrum for 1 M gemfibrozil solution. 16 scans with a total experiment time of 1 hour and 40 minutes. The spectrum was obtained on a desktop NMR spectrometer X-Pulse

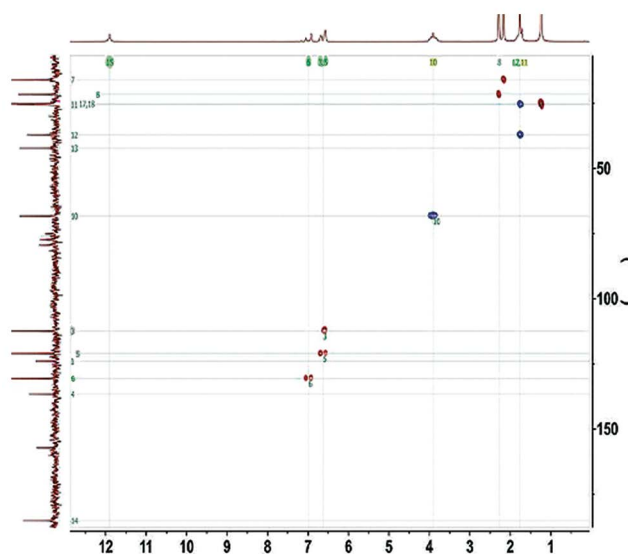


Рисунок 2. Спектр ME-HSQC для 1 М раствора гемфиброзила. 4 сканирования с общим временем эксперимента 35 мин. Спектр получен на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse. Числа на перекрестных пиках соответствуют пронумерованным позициям углеродных атомов на рисунке 1

Figure 2. ME-HSQC spectrum for 1 M gemfibrozil solution. 4 scans with a total experiment time of 35 min. The spectrum was obtained on the desktop NMR spectrometer X-Pulse. The numbers on the cross peaks correspond to the numbered positions of the carbon atoms in figure 1

логично эксперименту HSQC, сигналы от протона и углерода, которые непосредственно химически связаны, сопряжены через перекрестный пик в спектре ME-HSQC.

В дополнение, используемая импульсная последовательность позволяет получить взаимосвязь между фазой сигнала и количеством связей атома углерода с протонами, т. е. тип углеродного атома (первичный, вторичный, третичный, четвертичный). Пики групп CH_3 и CH являются положительными (красные на рисунке 2), а пики групп CH_2 являются отрицательными (синие на рисунке 2). Способность быстро определять тип углеродного атома важна для исследования строения. Одномерный углеродный спектр на рисунке 2 дает информацию лишь по амплитуде сигнала и не дает информацию о его фазе, поэтому пики групп CH_2 являются положительными. Полный двумерный спектр, полученный методом ME-HSQC для гемфиброзила, показан на рисунке 2.

Эксперимент HSQC дает ценную информацию об углеводородных функциональных группах, чего обычно достаточно для подтверждения известной структуры. Однако, этого недостаточно для установления строения неизвестной молекулы. В целом, определение строения требует больше информации о связях вдоль углеродного скелета молекулы. Эксперимент HMBC позволяет получить эту информацию.

В эксперименте HMBC сигналы от протонов коррелируют с сигналами от ядер углерода, расположенными на расстоянии 2, 3 иногда 4 связи друг от друга. При рассмотрении части углеводородной цепочки типа: $\text{C}^1 \text{H}^a - \text{C}^2 \text{H}^b - \text{C}^3 \text{H}^c$ в спектре ME-HSQC проявятся перекрестные пики между C^1 и H^a , C^2 и H^b , и C^3 и H^c . Перекрестный пик между C^2 и H^b будет отрицательным (синим). В спектре HMBC перекрестные пики HSQC будут подавлены, и вместо этого будут наблюдаться перекрестные пики C^1 с H^b и H^c , C^2 с H^a и H^c и C^3 с H^a

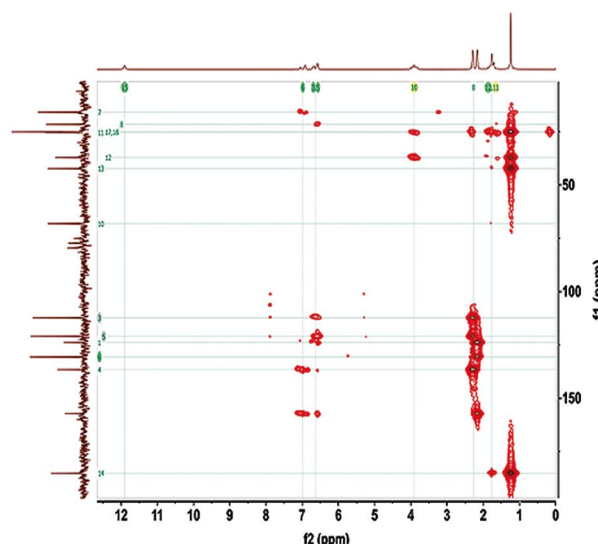


Рисунок 3. Спектр HMBC для 1 М раствора гемфиброзила. 16 сканирований с общим временем эксперимента 1 час 40 минут. Спектр получен на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse

Figure 3. HMBC spectrum for 1 M gemfibrozil solution. 16 scans with a total experiment time of 1 hour and 40 minutes. The spectrum was obtained on a desktop NMR spectrometer X-Pulse

и H^b . Комбинация двух спектров позволяет пользователю ЯМР определить углеводородный скелет молекулы и связанные с ним углеводородные группы. Полный спектр HMBC гемфиброзила показан на рисунке 3.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что настольный ЯМР-спектрометр X-Pulse является надежным инструментом для проведения экспериментов по гетероядерной корреляции. Эксперименты ME-HSQC, HMBC позволяют пользователям определять структуру совершенно неизвестных молекул путем получения корреляционных двумерных спектров на настольном приборе. Применение этих экспериментов позволяет получать более высокую чувствительность при измерении сигналов протонов и получать надежные данные по строению молекул неизвестных соединений менее чем за 3 часа.



Новейший настольный свободно конфигурируемый широкополосный ЯМР-спектрометр высокого разрешения

Предлагаем Вам провести БЕСПЛАТНЫЕ тестовые измерения с использованием Ваших образцов в нашем демонстрационном зале

Это даст Вам возможность оценить:

- все возможности метода ЯМР на вашем рабочем столе;
- высокое разрешение и хорошую чувствительность прибора;
- простоту и удобство переключения между ядрами и подстройки частоты;
- эффективность работы функции подавления сигнала растворителя;
- простоту работы с прибором и простоту обслуживания.

Вы также сможете:

- провести вместе с нашим оператором и самостоятельно одномерные и двумерные эксперименты на различных ядрах;
- провести съемку не только в дейтерированных, но и в обычных протонированных растворителях.

Вы можете приехать лично или прислать свои пробы бесплатно, в этом случае мы проведем исследование самостоятельно и вышлем вам обработанные результаты. Отправьте запрос на почту для получения услуги.

**Все ядра в одном
инструменте**



E-mail: chistyakov@avrora-lab.com

www.pulsarnmr.com

ООО «АВРОРА»

www.avrora-test.ru

АВРОРА
ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ

Рекламная статья / Sponsored article



Применение детектора заряженных аэрозолей (CAD, Thermo Fisher Scientific) для анализа биофармацевтических препаратов

Статья предоставлена компанией ООО «АВРОПА»

Настоящая работа посвящена проблемам определения критических компонентов и вспомогательных веществ биофармацевтических препаратов, таких как O-связанные гликаны, высвобождаемые из гликопротеинов путем восстановительного β -элиминирования; сиаловых кислот, а также адъювантов вакцин. Основной проблемой ВЭЖХ анализа таких соединений является отсутствие детектирующей системы, не зависящей от наличия или отсутствия хромофорных и флуорофорных группировок в молекуле и дающей практически универсальный отклик вне зависимости от химической структуры определяемых веществ. В статье дается характеристика детектора заряженного аэрозоля (CAD), применение которого дает возможность решить большинство проблем, связанных с детектированием бесхромофорных веществ. Статья демонстрирует несколько примеров, где CAD может применяться для обнаружения и количественного определения веществ, разделенных с помощью обращенно-фазовой хроматографии и хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Application of a Charged Aerosol Detector (CAD, Thermo Fisher Scientific) for the Analysis of Biopharmaceuticals

The article is presented by the company LLC "AVRORA"

The present work is devoted to the problems of identifying critical components and excipients of biopharmaceuticals, such as O-linked glycans released from glycoproteins by reductive β -elimination; sialic acids; and vaccine adjuvants. The main problem of HPLC analysis of such compounds is the absence of a detection system that is independent of the presence or absence of chromophore and fluorophore groups in the molecule and gives an almost universal response regardless of the chemical structure of the analyte. The article describes the characteristics of a charged aerosol detector (CAD), the use of which makes it possible to solve most of the problems associated with the detection of chromophore-free substances. The article demonstrates several examples where CAD can be used to detect and quantify substances separated by reverse phase chromatography and hydrophilic interaction chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время детектирование в УФ/видимой области спектра было «рабочей лошадкой» при анализе биофармацевтических препаратов, так как многие белки и другие активные биофармацевтические ингредиенты обычно обладают хорошим хромофором. Однако есть много случаев, когда, хотя сам биотерапевтический агент может быть УФ-активным, он имеет важные нехромофорные химические модификации, которые необходимо обнаруживать и измерять. В отличие от детекторов УФ/видимого диапазона, детектор заряженных аэрозолей (CAD) – это серийный детектор, который обеспечивает чувствительный, почти универсальный отклик для любого нелетучего аналита независимо от химического состава. Таким образом, он может обнаруживать вещества, не поглощающие в УФ/видимой области, обеспечивая ценные статистически достоверные данные (рисунок 1). CAD хорошо подходит для определения аналитов без хромофоров и без хромофорных меток, и их количественного определения. Благодаря своему универсальному отклику, детектор заряженных аэрозолей может использоваться во многих аналитических приложениях биофармацевти-

ческой практики, начиная от анализа высвобожденных гликанов и заканчивая количественным определением наполнителей рецептуры для контроля качества.

Эта статья демонстрирует несколько примеров, где CAD может применяться для обнаружения и количественного определения веществ, разделенных с помощью обращенно-фазовой хроматографии и хроматографии гидрофильных взаимодействий. Примеры включают: гликаны, сиаловые кислоты, поверхностно-активные вещества, адъюванты, белки и аминокислоты. Во многих случаях пределы обнаружения находятся в диапазоне низких нанограммов с хорошей точностью площади пика.

ПРОБЛЕМА ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИТОВ

Ни один детектор жидкостной хроматографии (ЖХ) не дает идеальных результатов. Часто один аналит реагирует сильнее, чем другой, или может вообще не реагировать. Что наиболее желательно, так это способность обнаруживать широкий спектр аналитов (универсальное обнаружение) с откликом, который обеспечивает точное количественное определение.

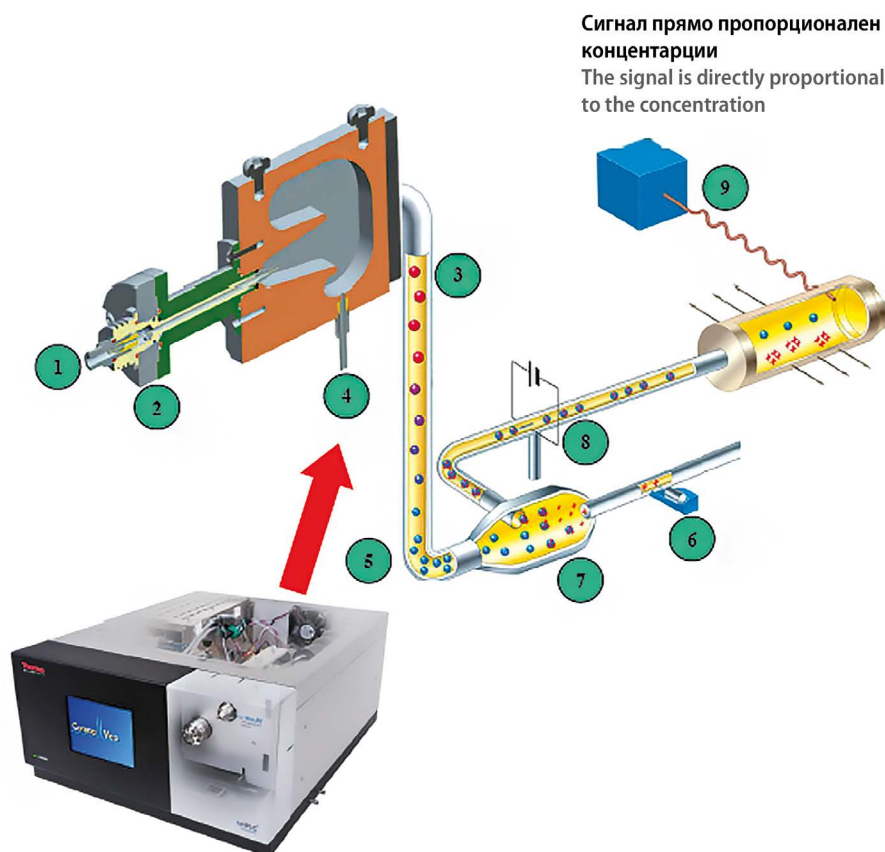


Рисунок 1. Принцип работы детектора заряженных аэрозолей.

Вверху слева (1) подвижная фаза из колонки LC, входящая в детектор распыляется путем объединения с концентрическим потоком азота или воздуха (2). Мелкие капли, переносимые объемным газовым потоком в нагретый сектор испарения (3), десольватируются с образованием сухих частиц (5) любых нелетучих или полунлетучих частиц. Любые оставшиеся крупные капли стекают в отходы (4). Сухие частицы аналита соединяются с другим газовым потоком, который заряжается высоковольтным зарядным устройством Согона (6). Заряженный газ передает положительный заряд поверхности частицы анализируемого вещества (7). Заряженные частицы анализируемого вещества проходят через ионную ловушку (8), которая удаляет любые высокоподвижные частицы, и попадают в коллектор, где они измеряются чувствительным электрометром. Производимый сигнал (9) прямо пропорционален количеству аналита

Детектор заряженных аэрозолей (CAD) может обнаруживать все нелетучие и многие полунлетучие аналиты с коэффициентом детектирования близким или равным единице.

Обнаружение заряженных аэрозолей – это метод, позволяющий измерять любые нелетучие и многие полунлетучие частицы. Эта технология обеспечивает более универсальное обнаружение, чем УФ, для которого требуется хромофор или масс-спектрометрия, требующая образования ионов газовой фазы. При обнаружении заряженного аэрозоля поток элюента распыляется, а капли сушатся для получения частиц анализируемого вещества, которые впоследствии заряжаются. Эта технология обеспечивает отличную однородность отклика, поскольку заряд частиц практически не зависит от физико-химических свойств соединения. Благодаря своей исключительной однородности отклика, CAD может использоваться для количественного определения нескольких аналитов с использованием одного калибранта. Количественное определение единичного калибранта

чрезвычайно полезно, когда недоступны определенные стандарты аналитов. Например, кривая отклика активного фармацевтического ингредиента (API) может использоваться для определения уровней неизвестных примесей.

Таким образом, весь процесс можно разделить на три простых шага:

1. Распыление. Обнаружение заряженного аэрозоля начинается с распыления элюента на капли, которые затем высушиваются на частицы. Размер частиц увеличивается с увеличением количества аналита.
2. Получение заряда. Поток заряженного газообразного азота сталкивается с частицами анализируемого вещества. При этом заряд передается частицам – чем крупнее частица, тем больше заряд.
3. Обнаружение. Заряженные частицы переносятся в коллектор, где совокупный заряд измеряется высокочувствительным электрометром, который генерирует сигнал, прямо пропорциональный количеству присутствующего аналита.

Исходя из того факта, что готовится общая фармакопейная статья «Определение гликанового профиля», целью данного исследования была разработка количественного анализ профиля для О-связанных гликанов, высвобождаемых из гликопротеинов путем восстановительного β-элиминирования.

Гликопротеины, представляющие биологический, диагностический или терапевтический интерес, ключевыми аспектами своей нормальной функции обязаны олигосахаридам, прикрепленным к белковой цепи. Изменения количества, типа, состава или характера связывания этих гликанов могут служить биомаркером заболевания или влиять на эффективность биотерапевтического продукта. По этой причине способность правильно идентифицировать и измерять эти гликановые представляет научный интерес, а возможность делать это надежно, быстро и недорого – имеет практическую пользу.

Гликановые – это полярные молекулы, которые слабо удерживаются на колонках для жидкостной хроматографии с обращенной фазой, но более сильно удерживаются на пористом графитовом углероде, HILIC, анионообменных или смешанных колонках. Поскольку N-связанные гликановые плохо обнаруживаются детекторами поглощения УФ/видимого света, отделенные гликановые обнаруживаются непосредственно с помощью импульсной амперометрии, масс-спектрометрии или флуоресценции после мечения 2-AA (2-аминобензойная кислота) или 2-AB (2-аминобензамид). Для обнаружения методом детектирования заряженных аэрозолей не требуется флуорофор или хромофор для чувствительной и точной количественной оценки, поэтому УВЭЖХ-CAD обеспечивает простой и прямой подход к разделению и количественной оценке нативных гликанов. В этом методе используется летучая подвижная фаза, полностью совместимая с масс-спектрометрией, если требуется дальнейшее определение характеристик.

Метод количественного анализ профиля для О-связанных гликанов, высвобождаемых из гликопротеинов путем восстановительного β-элиминирования

О-связанные гликановые высвобождаются из белков путем восстановительного β-элиминирования. Высвободившиеся гликановые разделяются с помощью жидкостной хроматографии сверхвысокого качества (УВЭЖХ) на новой платформе УВЭЖХ, которая интегрирует детектор заряженных аэрозолей в систему для повышения производительности и простоты использования. В аналитической колонке смешанного режима используются механизмы как слабого анионного обмена, так и HILIC-разделения для разделения гликанов на основе заряда, размера и полярности. Восстановленные гликановые обнаруживаются напрямую, без маркировки, с помощью обнаружения заряженного аэрозоля.

Приборное оснащение, режим

Система УВЭЖХ Thermo Scientific™ Vanquish™ с детектор заряженных аэрозолей:

- Температура испарения: 50 °С.
- Функция мощности: 1,00.
- Скорость сбора данных: 10 Гц.
- Фильтр сигнала: 5 сек.

Реагенты: чистоты для реагентов или для ЖХМС

Анализ данных:

Система хроматографических данных Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ (CDS) 7.2.

Разделение

Колонка: Thermo Scientific™ GlycanPac™ AXH-1 1,9 мкм, 2,1 × 100 мм.

Температура колонки: 30 °С, режим естественной конвекции.

Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Объем впрыска: 0,2–2 мкл.

Подвижная фаза А: 95: 5 ацетонитрил: деионизированная вода.

Подвижная фаза В: 50 мМ формиат аммония, pH 4,4.

Градиент: Время, % В: –8, 2; 0, 2; 60, 42 (наклон = 0,67 мМ/мин).

Подготовка образца

Thermo Scientific™ Dionex™ OligoStandard™ Силированные N-связанные альдиты фетуина были получены от Thermo Fisher Scientific (P/N 04360). В один флакон добавляли 500 мкл чистой воды для ВЭЖХ, перемешивали для растворения и переносили в полипропиленовый флакон для автоматического пробоотборника для ВЭЖХ. Galβ (1-3) GalNAc-α-Thr (TCI G0340) из VWR растворяли в деионизированной воде в концентрации 1 мг/мл. О-связанный гликан Core 1 высвобождался во время процедуры восстановительного β-элиминирования. Муцин, бычий подчелюстной тип 1-S (Sigma M3895), кроличьи поликлональные антитела против IgG H&L (VWR RL105-4102), фетуин из фетальной бычьей сыворотки (Sigma F3004) и коммерческое моноклональное антитело от частного донора получали растворением 10 мг +/- 1 мг в 1 мл воды, пригодной для ВЭЖХ. Пулы О-гликанов высвобождались путем восстановительного β-элиминирования.

Высвобождение О-гликанов

О-связанные гликановые не могут быть высвобождены одним ферментом, таким как PNGase F, обычно используемым для высвобождения N-связанных гликанов. Вместо этого О-связанные гликановые высвобождаются химическими методами, такими как восстановительное β-элиминирование. Химическое восстановление образует гликановые с одним концевым фрагментом, восстановленным до альдита, который не может быть флуоресцентно помечен (рисунок 2). Но это не представляет проблемы для обнаружения, потому что детектор заряженного аэрозоля

легко обнаруживает нативный гликан. Из-за однородного отклика детектора заряженного аэрозоля относительная площадь пика точно отражает количество каждого нелетучего аналита.

Разработка метода

По сравнению с N-связанными гликанами, разделенными в тех же условиях, O-связанные гликаны, исследованные в этой работе, обычно элюируются раньше и с меньшим разрешением. После предварительного изучения метода для оценки альтернативных колонок, таких как колонки GlycanPac AXR-1 и Thermo Scientific™ Accucore™ 150 Amide HILIC, на колонке GlycanPac AXH-1 был разработан подходящий метод для малых, полярных, нейтральных и заряженных O-связанных гликанов. Этот несколько общий метод максимизирует удержание малых, нейтральных и однозарядных гликанов, давая достаточно времени для элюирования возможных крупных и/или более высокозарядных гликанов. Последний метод был использован для анализа пулов O-связанных (верхняя хро-

матограмма) и N-связанных (нижняя хроматограмма) гликанов, высвобожденных из бычьего фетуина, которые сравниваются на рисунке 3. Идентификация пиков O-связанных гликанов присвоена предварительно до тех пор, пока не будет подтверждения с использованием MS.

Были проанализированы пулы O-связанных гликанов, высвобождаемые из различных белков, в том числе из бычьего фетуина, бычьего подчелюстного муцина и IgG. Представлены количественные характеристики, включая точность, пределы обнаружения и динамический диапазон. Показатели качества включают чувствительность на уровне колонки с низким нанограммом, динамический диапазон более двух порядков величины и точность площади пика, составляющую в среднем три процента RSD.

В таблице 1 представлены сводные данные о времени удерживания и точности площади пика для двух пиков, элюируемых в пределах временного окна удерживания, соответствующего O-гликанам плюс трисиалилированным и тетрасиалилированным

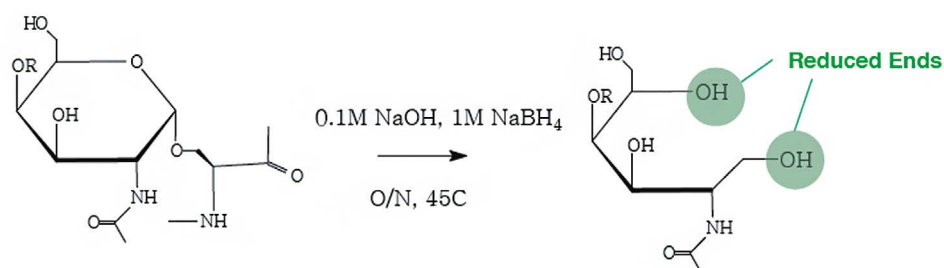


Рисунок 2. Альдиты, полученные восстановительным β-элиминированием, не могут быть помечены

Figure 2. Aldites obtained by reductive β-elimination cannot be labeled

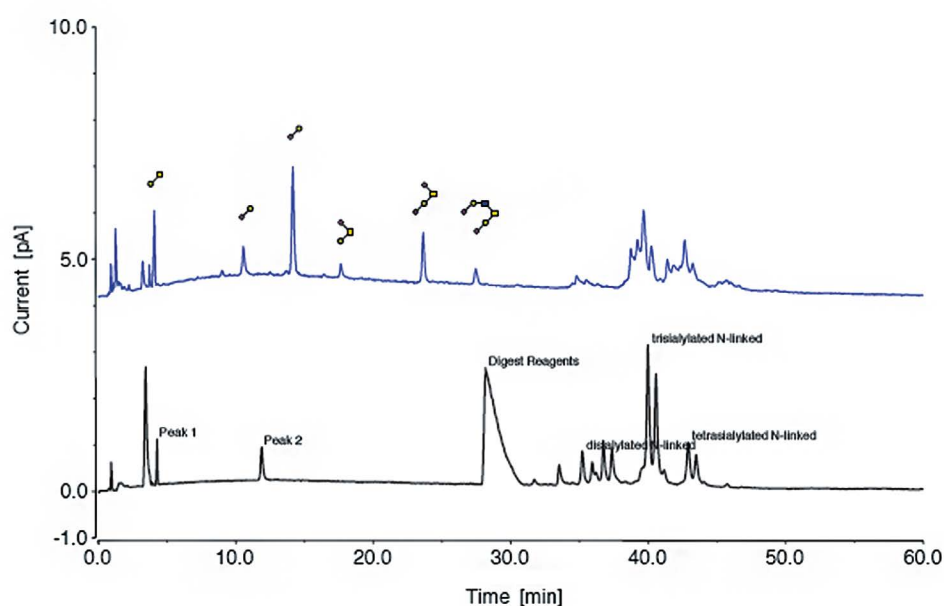


Рисунок 3. N- и O-связанные нативные гликаны, полученные из бычьего фетуина

Figure 3. N- and O-linked native glycan fragments derived from bovine fetuin

ным N-гликанам. Пределы обнаружения стандартов O-связанных гликанов не были определены для этой работы, но аналогичные методы для N-связанных гликанов дали пределы обнаружения в диапазоне низких нг/мкл и квадратичные калибровочные кривые в диапазоне от 1 до 200 нг/мкл.

Таблица 1. Сводные данные о времени удерживания и точности площади пика

Table 1. Summary of retention times and peak area accuracy

Компонент Component	Время удерживания (% RSD) Retention time (% RSD)	Площадь пика (% RSD) Peak area (% RSD)
Пик 1 Peak 1	0,06	3,3
Пик 2 Peak 2	0,04	3,7
Трисиалилированное производное Trisialylated derivative	0,01	3,5
Тетрасиалилированное производное Tetrasialylated	0,02	1,9
Среднее Average	0,03	3,1

Таким образом можно утверждать:

O-гликаны, высвобождаемые восстановительным β -элиминированием для сохранения структурной целостности, можно измерить количественно. Высвободившиеся гликаны разделяются с высоким разрешением по заряду, размеру и полярности на колонке смешанного режима, использующей как ионный обмен, так и разделение HILIC.

Метод УВЭЖХ, разработанный для измерения нативных O-связанных гликанов, является точным и чувствительным. Точность времени удерживания лучше, чем 0,1 % RSD, а точность площади пика в среднем составляет 3,1 %. Непосредственно реагируя на любые нелетучие соединения, обнаружение заряженных аэрозолей позволяет количественно определять немеченные O-связанные гликаны.

Близкий к единице коэффициент детектирования для обнаружения заряженных аэрозолей обеспечивает простую и относительно точную оценку концентрации, даже при отсутствии чистого первичного стандартного образца.

Метод. Определение сиаловых кислот с использованием детектора заряда аэрозоля

Сиаловые кислоты представляют собой компоненты клеточных рецепторов, которые специфичны для вирусов семейства Adenoviridae, ротавирусов (Reoviridae), вирусов гриппа (Orthomyxoviridae), а также для многих грамположительных бактерий. Накоплены факты, отражающие важнейшую роль сиаловых кислот в обеспечении устойчивости макроорганизма к патогенам различной природы, а также в разви-

тии соматической патологии и опухолеассоциированных процессов. Концентрация сиаловых кислот также возрастает при сиалидозе, инфаркте миокарда, онкологических заболеваниях, в том числе и при опухолях головного мозга. Особенно высокий рост этого показателя отмечается при активной форме туберкулеза и ревматизме, при паренхиматозной желтухе. После отщепления от белково-углеводных комплексов тканей свободных сиаловых кислот инактивируют многие бактериальные и вирусные агенты. Поэтому увеличение содержания в крови сиалогликопротеинов может быть проявлением компенсаторной, защитной реакции организма. Одной из многих причин формирования иммунологической несостоятельности при старении связывают с уменьшением концентрации сиаловых кислот в организме. Сиаловые кислоты способны выраженно изменять процесс распознавания опухолевых антигенов. Анализ частоты экспрессии разных антигенов на клетках различных опухолей во многих случаях может быть использован для оценки прогноза и степени злокачественности опухолевого процесса, а также для получения вакцин с целью иммунотерапии.

Будучи замещенными моносахаридами с 9 углеродными атомами, сиаловые кислоты не имеют в структуре хромофорных группировок, поэтому не обнаруживаются в рабочем диапазоне спектрофотометрических детекторов УФ/видимой области. Однако, прямое обнаружение высвобожденных сиаловых кислот из трансферрина человека и крупного рогатого скота возможно с использованием ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля.

Приборное оснащение, режим

Система УВЭЖХ Thermo Scientific™ Vanquish™ с детектором заряженных аэрозолей.

Колонка: Thermo Scientific™ Acclaim™ Trinity P2, 3 мкм, 2,1 × 100 мм.

Температура колонки: 30 °C.

Скорость потока: 0,3 мл/мин.

Объем впрыска: 5 мкл.

Подвижная фаза: 65/25/10 (ACN/вода/100 мМ формиат аммония, pH 4).

Метод. Определение адъювантов вакцин

Адъювант (от лат. *adjuvans* – «помогающий, под-держивающий») – соединение или комплекс веществ, используемое для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном. В отличие от иммуномодуляторов, они применяются для усиления конкретного иммунного ответа (например, при вакцинации) чаще всего в здоровом организме, а не для нормализации нарушенных реакций иммунной системы при патологии.

Адъюванты на протяжении десятилетий применяются для улучшения иммунного ответа на вакцинные антигены. Включение адъювантов в состав

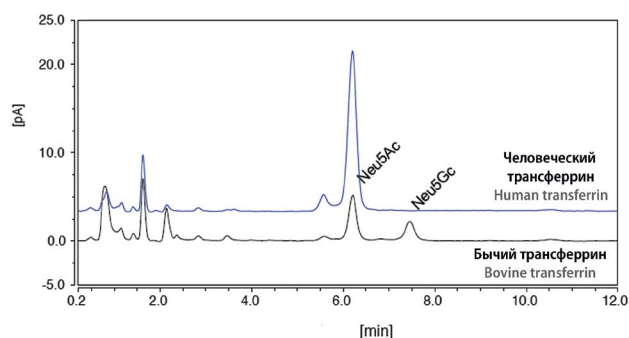


Рисунок 4. Прямое обнаружение высвобожденных сиаловых кислот из трансферрина человека и крупного рогатого скота с использованием ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля

Figure 4. Direct detection of released sialic acids from human and bovine transferrin using HPLC with charged aerosol detector

вакцин направлено на усиление, ускорение и prolongation специфического иммунного ответа до желаемого уровня. Таким образом, адъюванты играют ключевую роль в получении эффективного и длительного иммунитета.

Достаточно изученными и часто применяющимися адъювантами являются сапонины и производные холестерина, входящие в состав липосом. И сапонины, и производные холестерина практически не имеют хромофорных группировок, но с применением детектора заряженного аэрозоля возможно прямое определение этих адъювантов.

Приборное оснащение, режим

Система УВЭЖХ Thermo Scientific™ Vanquish™ с детектором заряженных аэрозолей.

Колонка: Thermo Scientific™ Accucore™ PFP 2,6 мкм, 2,1 × 100 мм.

Температура колонки: 50 °С.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Объем впрыска: 0,2 мкл.

Подвижная фаза А: 0,1 % муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Подвижная фаза В: 0,1 % муравьиной кислоты в соотношении 30:70 ацетонитрил: 2-пропанол.

Градиент: 25–70–70 % В при 0–4–9 мин.

Детектор: VCAD 2 Гц, 5 с, PF 1

Сравнение детектирования УФ (210 нм) и детектора заряженного аэрозоля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детекторы заряженных аэрозолей Thermo Scientific™ Vanquish™ и Thermo Scientific™ Corona™ Veo™ обеспечивают:

- Простое, интуитивно понятное управление.
- Широкий линейный и динамический диапазон.
- Чувствительность на уровне субнанограмм.
- Гибкость метода, охватывающая приложения ВЭЖХ с микропотоком и УВЭЖХ с одним небулайзером.
- Отклик детектора не зависит от структуры анализируемого вещества для всех нелетучих соединений.
- Превосходная чувствительность в сочетании с широким динамическим диапазоном для повышенной производительности.
- Единый калибратор для количественного определения нескольких аналитов, когда отдельные стандарты недоступны.

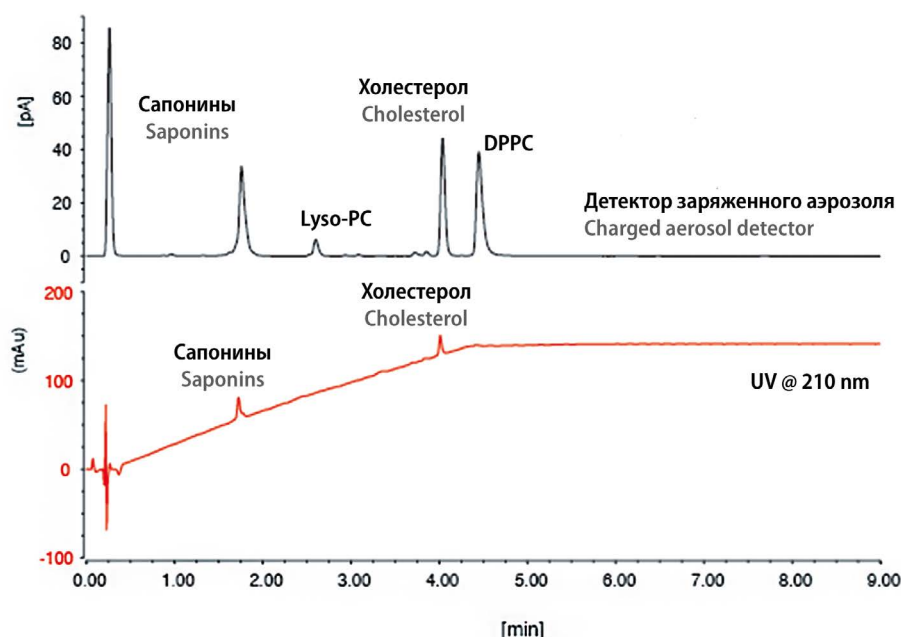


Рисунок 5. Сравнение детектирования УФ (210 нм) и детектора заряженного аэрозоля

Figure 5. Comparison of UV detection (210 nm) and charged aerosol detector for selected adjuvants

Рекламная статья / Sponsored article

Проектирование лабораторий под ключ

Статья предоставлена компанией ООО «ТД «ХИММЕД»



ООО «ТД «ХИММЕД» предлагает услуги по проектированию лабораторий различного профиля и их комплексному оснащению лабораторным и аналитическим оборудованием, расходными материалами и мебелью. По желанию заказчика возможна разработка предпроектной и проектной документации согласно Постановлению Правительства РФ от 16.02.2008 № 87.

Turnkey Laboratory Design

The article is presented by the company LLC "TH "HIMMED"

"TD "CHIMMED" LLC offers services of designing laboratories of various profiles and their complex equipment with laboratory and analytical equipment, consumables, and furniture. Development of pre-project and project documentation in accordance with the Decree of the Government of the Russian Federation No. 87 dated 02/16/2008 is possible on request.



ООО «ТД «ХИММЕД» осуществляет проектирование и комплексное оснащение лабораторий различного профиля:

- ПЦР лаборатория;
- микробиологическая лаборатория;
- лаборатория иммуноферментного анализа;
- лаборатория клеточных технологий;
- аналитическая лаборатория;
- лаборатории электрофореза и вестерн-блоттинга;
- лаборатория ветеринарной диагностики;
- лаборатория микроэлектроники.

✓ По желанию заказчика мы можем разработать:

- ✓ Предпроектные решения (технологическую разработку проекта с размещением оборудования согласно заявленной площади).

- ✓ Проектную документацию согласно Постановлению Правительства РФ от 16.02.2008 № 87 «О составе разделов проектной документации и требованиях к их содержанию».

- ✓ Раздел «Технологические решения».

- ✓ Раздел «Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха, тепловые сети».

Также мы осуществляем полную комплектацию лаборатории мебелью, оборудованием и расходными материалами согласно проекту.

В состав проектной документации входят следующие разделы:

1. ПЗ – пояснительная записка.
2. ПЗУ – схема планировочной организации земельного участка.

3. АР – архитектурные решения.
4. КР – конструктивные решения.
5. ИОС – сведения об инженерном оборудовании, о сетях инженерно-технического обеспечения, перечень инженерно-технических мероприятий, содержание технологических решений.
 - 5.1. ИОС1_ЭС – система электроснабжения.
 - 5.2. ИОС2_ВВС (ВК1) – система водоснабжения.
 - 5.3. ИОС3_ВВО (ВК2) – система водоотведения.
 - 5.4. ИОС4_ОВ (ОВиК) – отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха, тепловые сети.
 - 5.5. ИОС5_СС – сети связи.
 - 5.6. ИОС6 – системы газоснабжения.
 - 5.7. ИОС7_ТХ – технологические решения.
6. ПОС – проект организации строительства.
7. ПОД – проект организации работ по сносу или демонтажу объектов капитального строительства (при необходимости сноса или демонтажа).
8. ООС – перечень мероприятий по охране окружающей среды.
9. МПБ – мероприятия по обеспечению пожарной безопасности.
10. ОДИ – мероприятия по обеспечению доступа инвалидов.
 - 10.1. ЭЭ – мероприятия по обеспечению соблюдения требований энергетической эффективности и требований оснащенности зданий,

строений и сооружений приборами учета используемых энергетических ресурсов.

11. СМ – смета на строительство объектов капитального строительства.

12. Иная документация в случаях, предусмотренных федеральными законами.

*В проектную документацию возможно включить разделы выборочно.

Техническое задание на разработку документации по размещению испытательной лаборатории включает в себя следующие разделы:

1. Наименование объекта.
2. Назначение объекта.
3. Адрес объекта.
4. Заказчик.
5. Подрядчик.
6. Срок выполнения работ.
7. Исходные данные, предоставляемые Заказчиком.
8. Стадийность проектирования.
9. Объем работ по разработке документации.
10. Требования к пожарной безопасности.
11. Особые условия.
12. Разработка смет (сметной документации).
13. Требования к отчетным документам.

ООО «ТД «ХИММЕД»

г. Москва, Каширское шоссе, д. 3, корп. 2, стр. 4/9
(территория бизнес-центра «Сириус Парк»)

+7 (495) 640 41 92

e-mail: develop@chimmed.ru chimmed.ru

Информационная статья / Informational article

В мире вирусных угроз, персонализированной медицины и «цифры» – о чем говорили на OpenBio-2021

Подведены итоги восьмого комплекса отраслевых мероприятий в сфере биотехнологии, биофармацевтики и вирусологии OpenBio, который прошел в наукограде Кольцово Новосибирской области 5–8 октября. В работе научной конференции и делового форума приняли участие около 6 тыс. человек.

In the world of viral threats, personalized medicine and big data – main topics of OpenBio-2021

The results of the eighth set of industry events in the field of biotechnology, biopharmaceuticals and virology OpenBio, which took place in the Koltsovo science city of the Novosibirsk region on October 5–8, were summed up. About 6 thousand people took part in the scientific conference and business forum.



В сравнении с прошлым годом, аудитория OpenBio-2021 значительно выросла: 920 офлайн-участников, 5027 человек присоединились к площадкам онлайн. Расширилась география: на научной конференции и деловом форуме работали специалисты из 42 регионов Российской Федерации и 15 стран мира.

Научная конференция дополнилась новыми темами и форматами. В четырех традиционных секциях – вирусология, биотехнология, биофизика и молекулярная биология – прозвучали также доклады в сфере биоинформатики. Часть исследований молодые ученые представили в виде постеров, размещенных в фойе второго этажа здания Биотехнопарка. Победителями научной конференции стали:

- **Анастасия Гладышева**, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», в секции «Вирусология» за моделирование и

анализ структур нового многокомпонентного вируса Kindia tick virus;

- **Мария Боргоякова**, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», в секции «Биотехнология» за результаты по возникновению иммунного ответа от вакцины Комбикоронавак у мышей;
 - **Зарет Дениева**, Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, в секции «Биофизика» за исследование механизмов инфицирования оболочечными вирусами;
 - **Сергей Шарабрин**, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», в секции «Молекулярная биология», за доклад о применении МРНК-вакцины против SARS-COV-2.
- Лучшими постерными докладами жюри признало работы **Татьяны Налимовой** в секции «Вирусология», **Дениса Кисакова** в секции «Биофизика»,

Виктории Литвиновой в секции «Биотехнология» (все трое – из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор») и **Кристины Патры** из Университета ИТМО в секции «Молекулярной биологии».

«Наша научная конференция обеспечивает среду для встреч и общения, для представления своих докладов и понимания того места в жизни, в котором молодые ученые находятся. Сегодняшняя конференция, по сравнению с предыдущими годами, продвинулась очень сильно по составу, тематическому разнообразию, количеству ученых, как молодых, так и маститых. И это та инфраструктура, в которой будут вырастать будущие звездочки, которые определяют формирование научной школы и станут локомотивами прогресса», – отметил **Валерий Локтев**, председатель жюри секции «Вирусология», д. б. н., профессор, руководитель отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Перед участниками научной конференции выступили с установочными лекциями ученые мирового уровня. **Михаил Михайлов**, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией вирусных гепатитов научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, рассказал об эволюции диагностики, профилактике и лечении вирусных гепатитов в СССР и России.

Ежегодно на OpenBio взаимодействуют представители фундаментальной науки и инновационного бизнеса. Производители продуктов, инструментов и сервисов от разработки до производства, представляют свои разработки на выставке, а также выступают с профильными докладами для разработчиков и производителей. **Екатерина Авилова**, к. б. н., руководитель отдела по работе с клиентами компании Cytiva, рассказала слушателям научной конференции об инновациях, которые можно применять в разработке и производстве биофармацевтических препаратов: применении сред и сорбентов для повышения урожайности и качества продукта, одноразовых биореакторах и масштабируемой линейке хроматографических систем и колонн для быстрого запуска производственных линий, а также технологиях и алгоритмах оптимизации процессов.

«Каждый разработчик хочет как можно быстрее и качественнее масштабировать пилотное производство, пройти через все стадии клинических испытаний, чтобы минимизировать фактор изменчивости и количество расходных материалов. Если во время испытаний возникают какие-то трудности, их можно быстрее преодолеть, применяя компьютерное моделирование и алгоритмы. Как поставщики технологий, на OpenBio мы получаем срез сегодняшней науки и инноваций. Мы учимся, слышим и понимаем, куда движется индустрия, что будет актуально



на рынке через несколько лет», – поделилась **Екатерина Авилова**.

Деловой форум в этом году расширился и заполнил своими площадками все четыре дня OpenBio. Особое внимание на форуме уделили вирусологической повестке. Состоялся ряд разноформатных мероприятий: пленарное заседание и симпозиум, экспертные дискуссии и круглые столы.

Ведущие вирусологи и представители фармкомпаний продолжили прошлогоднюю дискуссию о противодействии коронавирусной пандемии. **Сергей Нетесов**, модератор площадки, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией биотехнологии и вирусологии Факультета естественных наук НГУ, передал суть обсуждения: «Мы подвели предварительные итоги с перспективами на будущее, обсудили текущую ситуацию с пандемией и диагностическими возможностями, разработку новых вакцин, и посмотрели, насколько реально побороть эту коронавирусную инфекцию в ближайшие год-два. Также мы поговорили о положении дел в разных странах. Конкретно в России оно очень тяжелое, это связано с низким охватом вакцинации, поэтому участники обсудили новые подходы к подаче данных по вакцинам и их главной роли в победе над пандемией».

По инициативе Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» на OpenBio-2021 был организован научный симпозиум «ВИРОМ России». Большое внимание участников привлек доклад об эволюции вирусов биолога с мировым именем **Евгения Кунина**, члена Национальных академий наук США, России и Европы, ведущего научного сотрудника Национального центра биотехнологической информации (штат Мэриленд). Логикой симпозиума, как объяснил **Александр Агафонов**, заместитель генерального директора «Вектора», было обсуждение необходимости консолидации усилий для подготовки к новым эпидемиям и созданию средств диагностики, профилактики и лечения.

«Проблема вирусов стала более острой после последней пандемии. Мы все убедились, как один вид вируса может изменить устройство человеческого общения. Мировая экономика получила колоссаль-



ный урон. Но самые страшные потери – это 5 млн человек, погибших от пандемии», – пояснил **Александр Агафонов**.

Широкое обсуждение развернулось на круглом столе «ВИЧ в России: новейшие разработки и проблемы фарммедобращения», где собрались активисты, пациенты, врачи и ученые, ведущие исследования в области борьбы с ВИЧ. Эксперты из разных регионов России обсудили важность обеспечения ранней диагностики и приверженности терапии, тенденции и проблемы в получении помощи людьми, живущими с ВИЧ, модели тестирования, стигматизацию, перспективы современных научных подходов к лечению. В финале дискуссии участники отметили важность комплексного подхода к решению проблемы эпидемии ВИЧ и ценность открытого диалога.

Важным событием стало пленарное заседание, посвященное вопросам больших данных в проектах мегасайнс, обсуждению взаимодействия между центром коллективного пользования «Сибирский кольцевой источник фотонов» и будущим суперкомпьютерным центром «Лаврентьев». В ходе дискуссии, как отметил **Михаил Марченко**, директор Института вычислительной математики и математической геофизики СО РАН, «в большей мере пришло осознание, насколько серьезная стоит задача по созданию цифровой обвязки ЦКП СКФ».

Другую задачу обсуждения назвал **Михаил Воєвода**, академик РАН, директор федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, заместитель председателя СО РАН: «Самый большой научный вызов находится в области лайфсайнс. Сейчас в США, Европе, Китае реализуются масштабные проекты с такими названиями как «Миллион геномов», «100 тысяч геномов». В рамках этих проектов помимо генетической информации, будут получены и другие характеристики живой материи, и все это предстоит анализировать в едином комплексе для получения принципиально важной информации для решения вопросов здраво-

охранения, создания новых лекарственных препаратов и обеспечения устойчивого функционирования нашего общества».

Самой продолжительной по времени площадкой стала экспертная сессия «Технологии жизни». На ней обсуждались научные методы и практики, позволяющие людям оставаться здоровыми и жить существенно дольше. В этом году на площадке звучали как доклады в научно-популярном стиле, так и узкоспециализированные выступления. Эксперты рассказали о влиянии генетики на старение, гигиене рта и эстетике лица, молодости кожи. «Очень важный доклад был посвящен борьбе со стрессом в современном мире, ведь когда мы говорим о долголетии, то подразумеваем, в том числе, здоровье нашего мозга, памяти и интеллекта», – поделился **Артем Елмуратов**, модератор сессии, сооснователь и директор по развитию медикогенетического центра Genotek.

Юлия Смирнова, со-модератор площадки, автор и ведущая программы «Молодость и долголетие» на Mediametrics, сообщила, что в следующем году организаторы планируют сделать акцент на здоровье мозга и уже сейчас приглашают экспертов из США, Германии, Японии и Китая.

На OpenBio-2021 состоялся экспертный диалог «Сделка с интеллектом» с участием **Леонида Гурьева**, патентного юриста США, адвоката, партнера в Muncy, Geissler, Olds & Lowe, и **Андрея Москвича**, руководителя центра интеллектуальной собственности и передачи технологий НТУ «Сириус», патентного поверенного РФ и Евразии. **Гурьев**, на брифинге по итогам диалога, назвал два самых животрепещущих вопроса со стороны российского бизнес-сообщества: «Первый вопрос, который я обсуждаю каждый раз, когда приезжаю в Россию – кто владеет интеллектуальной собственностью: компания, институт или разработчик? Эти проблемы владения всегда очень остро стоят здесь, реалии коммерческого права в России все же отличаются от того, что есть в США. Второй вопрос – это качество патентов. Что это означает – «иметь хорошую патентную заявку». На OpenBio мы обсудили, что нужно для этого сделать и как потом эту заявку коммерциализировать».



Как и в прошлом году, на площадках OpenBio прошла отдельная дискуссия по фудтеху. На ней выступил **Виктор Малеев**, академик РАН, советник директора по научной работе Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора с докладом о проблемах питания населения. По итогам дискуссии **Анна Ненахова**, модератор площадки, генеральный директор ООО «Уралхим Инновация», в качестве отличительной особенности обсуждения, отметила разность экспертных подходов: «Все озабочены экологической повесткой, все говорят, что сельское хозяйство выделяет много метана и это плохо сказывается на планете, и что невозможно всех прокормить животным белком, ключевым материалом для строительства организма. Мы рассмотрели альтернативы, связанные с растительными источниками белка, например, белок из насекомых».

Круглый стол «Развитие экосистемы технологического трансфера» был посвящен обмену опытом и мнениями между регионами, в части наработок и затруднений. Вице-губернатор Новосибирской области **Ирина Мануйлова** в своем вступительном слове объяснила важность круглого стола: «В Новосибирской области создаются три центра трансфера технологий. Исполнительной власти важно выстроить взаимодействие с ними, принять их уникальность и поддержать всеми мерами содействия, которые им потребуются, чтобы наработки инновационного бизнеса дошли до реального внедрения. Для короткого и эффективного пути необходимо предпринять усилия разных институтов». **Екатерина Шехтман**, патентный поверенный, директор агентства «ИНКО» отметила, что негативный опыт и предложения, озвученные на круглом столе, могут помочь новосибирским центрам трансфера технологии выстроить свою работу на новом уровне.

Еще одной новой площадкой стала специализированная дискуссия «Снижение рисков в профилактике и лечении неинфекционных заболеваний» с участием федеральных специалистов по онкологии, пульмонологии и сердечно-сосудистым заболеваниям. **Александр Розанов**, модератор площадки, помощник директора по региональному развитию и федеральным проектам «Российского геронтологического научно-клинического центра» при университете имени Н. И. Пирогова Минздрава РФ, обозначил логику обсуждения так: «Концепция снижения вреда – это эффективная стратегия, которую с успехом можно применить для модификации большинства факторов риска хронических неинфекционных заболеваний, так как пациенты охотнее предпринимая небольшие шаги для изменения своей жизни, чем решаются на глобальные перемены. Я сторонник того, чтобы двигаться от парадигмы приказа к парадигме сотрудничества и в этом сотрудничестве ставить перед пациентами реальные и достижимые цели, которые позволяют



им путем наименьшего сопротивления встать на путь здорового образа жизни».

В дни форума состоялось подписание соглашения о сотрудничестве между Ассоциацией по развитию инновационного территориального кластера Новосибирской области в сфере биофармацевтических технологий «Биофарм» и Ассоциацией биопреприятий Хоккайдо, Япония.

Подводя итоги всего комплекса мероприятий, **Юлия Линюшина**, руководитель OpenBio, поделилась своим комментарием: «Эволюция OpenBio отвечает на растущую потребность углубить диалог. На площадках поднимались серьезнейшие вопросы науки и ее стыковки с жизнью общества. Четырехдневный формат параллельной работы форума и конференции оправдал себя, планируем продолжать эту практику. Мы имеем возможность подключать топовых международных экспертов благодаря развитой онлайн-инфраструктуре OpenBio и новой архитектуре события. Отмечу расширение сотрудничества с «Вектором», площадка по виromу получила большое внимание со стороны прессы и научного сообщества».

Организатор OpenBio-2021: АНО «Инновационный центр Кольцово» при поддержке Правительства Новосибирской области и Администрации наукограда Кольцово.

Соорганизаторы: ГНЦ ВБ «Вектор», Биотехнопарк Кольцово, Ассоциация «Биофарм», Новосибирский Государственный Университет.

Организационные партнеры: Новосибирский областной инновационный фонд, Центр Регионального Развития Новосибирской области, Инфраструктурный центр HealthNet, программа «Молодость и долголетие с Юлией Смирновой».

Стратегические партнеры: Beckman Coulter Life Sciences, Cytiva, Р-Фарм

Официальные партнеры: «Биокад», «Реттенмайер Рус», «Гринвэн», «Физлабприбор», PMI Science, Prime-Line Trading, Ботаника Девелопмент.

Партнеры научной конференции: Eppendorf, «АЗИМУТ ФОТОНИКС», «Компания Хеликон», «Диаэм», «Интерлабсервис», «БМТ».

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

➤ Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала

➤ e-mail-маркетинг (в базе 12000+ адресов)

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



О журнале

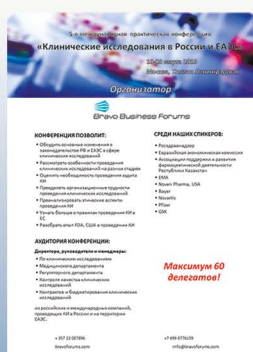
Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:

- ✓ 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 ВАК, SCOPUS.

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



- ✓ Фармацевтического форума стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российского Фармацевтического Форума.
- ✓ GMP-конференции с международным участием.
- ✓ Конференции «Дженерики и биосимиляры в России и ЕАЭС».
- ✓ Выставки «iPhEB Russia».
- ✓ Международной конференции «Что происходит на фармацевтическом рынке?».
- ✓ Выставки «Аналитика Экспо».
- ✓ Форума Биотехмед.

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

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-28-35>
УДК 615.011.4



Оригинальная статья / Research article

Изучение физико-химических свойств субстанции этравирин

С. А. Золотов¹, Е. С. Пономарев^{1*}, И. А. Даин¹, Н. Б. Демина², А. С. Золотова¹

¹ ООО «АМЕДАРТ», 109316, Россия, г. Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корп. 24

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

*Контактное лицо: Пономарев Евгений Сергеевич. E-mail: eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: С. А. Золотов – <https://orcid.org/0000-0002-1852-7615>; Е. С. Пономарев – <https://orcid.org/0000-0003-2538-5544>; И. А. Даин – <https://orcid.org/0000-0002-8101-0758>;

Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; А. С. Золотова – <https://orcid.org/0000-0003-2854-1653>.

Статья поступила: 23.04.2021

Статья принята в печать: 07.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. «Этравирин» является одним из востребованных антиретровирусных препаратов, однако его физико-химические свойства недостаточно описаны в научных публикациях. Подробная информация о свойствах субстанции необходима как для организации синтеза, так и для обоснования лекарственной формы и технологии ее получения, а также для выявления узких мест и критических параметров, влияющих на качество готового продукта.

Цель. Изучение физико-химических свойств этравирин для моделирования дизайна исследований по созданию инновационной лекарственной формы.

Материалы и методы. Этравирин (MSN Life Sciences Pvt. Ltd., Hetero Labs Ltd.). Температуру плавления определяли капиллярным методом. Образцы этравирин изучали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), рентгеновской порошковой дифрактометрии, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Размер частиц определяли с помощью лазерной дифракции света. Форму и размер кристаллов определяли с применением просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Концентрацию этравирин в водных средах определяли с использованием метода ВЭЖХ при помощи флуориметрического детектора. Концентрацию этравирин в органических растворителях определяли спектрофотометрически.

Результаты и обсуждение. При помощи рентгеновской порошковой дифрактометрии и спектрометрии в ИК-области установлено, что исследованные субстанции представляют собой одну и ту же полиморфную модификацию. Температура плавления этравирин находится в диапазоне от 259 до 263 °С. Плавление сопровождается разложением. Субстанция практически нерастворима в водных средах при значениях pH в диапазоне от 1,2 до 6,8, растворима в некоторых органических растворителях, легко растворима в диметилсульфоксиде, тетрагидрофуране, N,N-диметилформамиде и N,N-диметилацетамиде. Коэффициент распределения в системе растворителей «октанол-1/фосфатный буферный раствор pH 6,8» составил 5,22. Экспериментально показано, что субстанция этравирин – липофильная. Было установлено, что этравирин является высококристаллическим веществом и представляет собой кристаллы, имеющие форму вытянутых игольчатых призм.

Заключение. Этравирин – липофильная, практически нерастворимая в водных растворах, растворимая в ряде органических растворителей субстанция. Изученные субстанции оказались одной полиморфной модификацией. Так как плавление субстанции сопровождается разложением, следует избегать процессов технологической обработки при высоких температурах.

Ключевые слова: этравирин, растворимость, температура плавления, просвечивающая электронная микроскопия, лазерная дифракция света, рентгеновская порошковая дифрактометрия, ИК-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия

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

Вклад авторов. С. А. Золотов, Е. С. Пономарев, И. А. Даин и Н. Б. Демина придумали и разработали эксперимент. Авторы Е. С. Пономарев и И. А. Даин провели исследование растворимости, определили температуру плавления, а также исследовали образцы с использованием рентгеновской порошковой дифрактометрии. А. С. Золотова провела исследования методами ДСК и ПЭМ. И. А. Даин и С. А. Золотов провели исследования методом лазерной дифракции света. С. А. Золотов провел исследование методом ИК-спектроскопии. С. А. Золотов и А. С. Золотова провели исследование методом ЯМР-спектроскопии. Авторы С. А. Золотов и Е. С. Пономарев участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Золотов С. А., Пономарев Е. С., Даин И. А., Демина Н. Б., Золотова А. С. Изучение физико-химических свойств субстанции этравирин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):28–35. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-28-35>

Study of the Physicochemical Properties of the Etravirine Substance

Sergey A. Zolotov¹, Evgenii S. Ponomarev^{1*}, Igor A. Dain¹, Natalia B. Demina², Anna S. Zolotova¹

¹ LLC "AMEDART", 42/24, Volgogradskiy avenue, Moscow, 109316, Russia

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

*Corresponding author: Sergey A. Zolotov. E-mail: eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: Sergey A. Zolotov – <https://orcid.org/0000-0002-1852-7615>; Evgenii S. Ponomarev – <https://orcid.org/0000-0003-2538-5544>; Igor A. Dain – <https://orcid.org/0000-0002-8101-0758>;

Natalia B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Anna S. Zolotova – <https://orcid.org/0000-0003-2854-1653>.

Received: 23.04.2021

Revised: 07.09.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Etravirine, being one of the most popular antiretroviral drugs, doesn't have its physicochemical properties sufficiently described in scientific publications. Detailed information on the substance properties is necessary both for organizing the synthesis and for justifying the dosage form and technology for its production, as well as for identifying bottlenecks and critical parameters that affect the quality of the finished product.

© Золотов С. А., Пономарев Е. С., Даин И. А., Демина Н. Б., Золотова А. С., 2021

© Zolotov S. A., Ponomarev E. S., Dain I. A., Demina N. B., Zolotova A. S., 2021

Aim. Study the etravirine physicochemical properties to model the design of studies to create an innovative dosage form

Materials and methods. Etravirine (MSN Life Sciences Pvt. Ltd., Hetero Labs Ltd.). The melting point was determined by the capillary method. Etravirine samples were studied via differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffractometry, IR and NMR spectroscopy. Particle size was determined using laser diffraction analysis. The shape and size of the crystals were determined with the help of transmission electron microscopy (TEM). The concentration of etravirine in aqueous media was determined using the HPLC method with a fluorescence detector. The concentration of etravirine in organic solvents was determined spectrophotometrically.

Results and discussion. The X-ray powder diffractometry and IR spectroscopy helped to determine the fact that the studied substances represent the same polymorphic modification. The melting point of etravirine ranges from 259 to 263 °C. Melting is accompanied by decomposition. The substance is practically insoluble in aqueous media at pH values in the range from 1.2 to 6.8, soluble in some organic solvents, readily soluble in dimethyl sulfoxide, tetrahydrofuran, dimethylformamide, dimethylacetamide. The distribution coefficient in the "1-octanol/phosphate buffer solution pH 6.8" solvent system was 5.22. The experiment showed that the etravirine substance is lipophilic. Etravirine is found to be a highly crystalline substance and represents needle-shape prismatic crystals.

Conclusion. Etravirine is a lipophilic substance, practically insoluble in aqueous solutions, soluble in a number of organic solvents. The studied substances turned out to be the same polymorphic modification. Since the melting of the substance is accompanied by decomposition, high temperatures processes should be avoided.

Keywords: etravirine, solubility, melting point, transmission electron microscopy, laser diffraction analysis, X-ray powder diffractometry, IR spectroscopy, NMR spectroscopy

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

Contribution of the authors. Sergey A. Zolotov, Evgenii S. Ponomarev, Igor A. Dain and Natalia B. Demina – conceptualization, methodology. Evgenii S. Ponomarev and Igor A. Dain – solubility and melting point determination, X-ray diffraction investigation. Anna S. Zolotova – DSC and TEM investigation. Igor A. Dain and Sergey A. Zolotov – laser diffraction analysis. Sergey A. Zolotov – IR spectroscopy investigation. Anna S. Zolotova and Sergey A. Zolotov – NMR spectroscopy investigation. Sergey A. Zolotov and Evgenii S. Ponomarev – data analysis. All authors – results evaluation and writing of the article: review and editing.

For citation: Zolotov S. A., Ponomarev E. S., Dain I. A., Demina N. B., Zolotova A. S. Study of the physicochemical properties of the etravirine substance. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):28–35. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-28-35>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из востребованных препаратов в терапии ВИЧ является «Этравирин» – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ) второго поколения вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

Этравирин относится к IV классу биофармацевтической классификационной системы (БКС) [1–2]. Субстанция практически нерастворима в водных средах и характеризуется низкой проницаемостью. Для повышения биодоступности этравирин применяют твердые дисперсии на основе водорастворимого полимера [1, 3–4], препарат продается под торговым названием Интеленс®, таблетки 25 мг, 100 мг, 200 мг. В ходе получения твердых дисперсий применяются различные технологические процессы, способные повлиять на свойства препарата, такие как, например, экструзия горячего расплава [5], растворение в различных растворителях [6], которые могут негативно повлиять на качество готовой продукции. Поэтому для фармацевтической разработки крайне важно подробное изучение физико-химических свойств активных субстанций, таких как липофильность, температура плавления, растворимость в водных средах и органических растворителях [7, 8], константа диссоциации, влияние на эту характеристику вспомогательных веществ [9, 10] и другие.

«Этравирин» является одним из востребованных антиретровирусных препаратов. Одной из важных характеристик активных субстанций, связанных с адсорбцией и рекомендуемых для определения на предварительных этапах фармацевтической разработки, является константа диссоциации pK_a [11–13]. В работе [14] сообщалось о значении $pK_a = 3,75$ для этравирин, ее значение соответствует слабой кислоте, следовательно молекула находится в неионизированном состоянии при низких значениях pH, что увеличивает ее проницаемость [15], предпочтительным местом всасывания будет являться желудок. В литературе сообщается [1, 6, 16] о том, что для этравирин характерны полиморфные модификации и сольватоморфизм (псевдополиморфизм). Различные модификации молекулы субстанции могут обладать различной эффективностью, поэтому необходимо знание структуры используемой субстанции. Чтобы охарактеризовать различные полиморфные формы вещества используются рентгеновская порошковая дифрактометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Полученные сведения о физико-химических свойствах фармацевтических субстанций необходимы как для организации синтеза, так и для обоснования лекарственной формы и технологии ее получения, а также для выявления узких мест и кри-

тических параметров, влияющих на качество готового продукта [9, 17]. Несмотря на высокую актуальность этравирина, его физико-химические свойства недостаточно описаны в научных публикациях.

Целью работы являлось изучение физико-химических свойств этравирина для моделирования дизайна исследований по созданию инновационной лекарственной формы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили:

- этравирин, MSN Life Sciences Private Limited (Индия), серия № EV0101118;
- этравирин, Hetero Labs Limited (Индия), серия № EA0101214.

Растворители: N,N-диметилформамид, для ВЭЖХ (Avantor®, США); диметилсульфоксид, для ВЭЖХ (PanReac, Испания); N,N-диметилацетамид, для ВЭЖХ (JK Chemical, Индия); тетрагидрофуран (ТГФ), для ВЭЖХ (PanReac, Испания); ПЭГ-400, соответствует USP/EP (Croda Inc., Великобритания); 2-бутанон для ВЭЖХ (Acros Organics, США); ацетон, для ВЭЖХ (PanReac, Испания); 1-метокси-2-пропанол, для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США); этилацетат, для ВЭЖХ (Baker, США); дихлорметан, для ВЭЖХ (Fluka, США); ацетонитрил, для ВЭЖХ (ООО «ТД «ХИММЕД», Россия); диэтиловый эфир, для ВЭЖХ (ОАО «Медхимпром», Россия); метиловый спирт, для ВЭЖХ (Baker, США); этиловый спирт, для ВЭЖХ (Merck, Германия); пропиленгликоль, для ВЭЖХ (АО «БЕКТОН», Россия); 4-метил-2-пентанол, для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США); 1-октанол, для ВЭЖХ (PanReac, Испания); изопропиловый спирт, для ВЭЖХ (АО «БЕКТОН», Россия); толуол, для ВЭЖХ (ООО «ТД «ХИММЕД», Россия).

В работе использовали буферные растворы и растворы кислот, приготовленные в соответствии с ГФ XIV.

Температуру плавления определяли капиллярным методом в соответствии с ОФС.1.2.1.0011.15, в качестве жидкости для бани выступал раствор K_2SO_4 в концентрированной H_2SO_4 (3:7 по массе).

Термические свойства образцов этравирина изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе Q20P (TA Instruments, США). Измерения проводили в атмосфере воздуха при скорости нагрева 10 °С/мин. Температура нагревания – до 300 °С. Подготовка пробы: точную навеску этравирина $10,0 \pm 0,1$ мг помещали в платиновый тигель, закрывали крышкой без отверстия и прессовали. Второй тигель оставался пустым.

Растворимость оценивали по концентрации насыщенного раствора, который получали растворением избытка субстанции в растворителе при 20 °С, в течение 24 ч при перемешивании на магнитной мешалке MR Hei-Тес (Heidolph, Германия) при скорости перемешивания 100 об/мин. Пробу пропускали через тефлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм. Концентрацию этравирина в органических растворителях определяли спектрофотометрически согласно

ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Концентрацию этравирина в водных растворах определяли методом ВЭЖХ. Используемая система ВЭЖХ состояла из ВЭЖХ-насоса LC-30AD (Shimadzu Corporation, Япония), автосамплера SIL-30AC (Shimadzu Corporation, Япония) и флуориметрического детектора Prominence RF-20A (Shimadzu Corporation, Япония). Разделение осуществляли с помощью колонки ACQUITY UPLC® BEH C18 (50 × 2,1 мм, размер частиц 1,7 мкм, Waters, США). Система ВЭЖХ работала при 50 °С с подвижной фазой, состоящей из H_3PO_4 , воды и ацетонитрила в объемном соотношении 0,7:139,3:260. Объем вводимой пробы составил 10 мкл, скорость потока – 0,1 мл/мин. Детектирование проводили при $\lambda(еx) = 305$ нм, $\lambda(em) = 405$ нм, время хроматографирования составляло 9 мин, время удерживания этравирина – 5,5 мин.

Стандартный раствор. Около 10 мг образца этравирина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл ацетонитрила и обрабатывали на ультразвуковой бане в течение 20 минут или до полного растворения, охлаждали до комнатной температуры и доводили объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивали. Полученный раствор разбавляли подвижной фазой до концентрации этравирина 10 нг/мл.

При определении коэффициентов распределения в микропробирки вносили по 3 мл насыщенного раствора этравирина в октанол-1, добавляли по 3 мл насыщенного раствора этравирина в среде буферных растворов, имеющих pH 1,2, 4,5 и 6,8. Пробирки перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин при скорости 300 колебаний в минуту на смесителе «Вортекс», после чего пробы центрифугировали в течение 20 мин при скорости 13 000 об/мин.

Для исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) образцы в виде порошка наносили на двустороннюю проводящую углеродную ленту (SPI Supplies, США), прикрепленную к алюминиевому столу. Затем образцы были покрыты золотом (толщина слоя 5 нм) с использованием SPI-MODULE Sputter Coater (SPI Supplies, США). Анализ образцов проводили на двухлучевом растровом электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режиме высокого вакуума с ускоряющим напряжением, равным 10 кВ.

Размер частиц этравирина определяли согласно ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света» на анализаторе с сухим модулем Microtrac (США).

Рентгеновскую порошковую дифрактометрию высушенных образцов проводили с использованием автоматического порошкового дифрактометра Ultima IV (Rigaku, Япония) в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0011.15 «Рентгеновская порошковая дифрактометрия».

ИК-спектры получали с помощью ИК-Фурье спектрометра VERTEX 70 (Bruker, США). ИК-спектры регистрировали без дополнительной пробоподготовки при помощи приставки нарушения полного внутреннего

отражения (НПВО) Pike MIRacle (однократное отражение) с кристаллом алмаз/ZnSe.

ЯМР-спектр получали на ЯМР-спектрометре Avance III NanoBay (Bruker, США) при частоте 300 МГц на ядрах ^1H . Образцы растворяли в ДМСО- d_6 , спектры регистрировали с использованием стандартных методов Bruker в режиме термостабилизации при 25 °C.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV с применением программы StatSuite на платформе iOS и Microsoft Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этравирин представляет собой порошок белого цвета. В спецификации производителя MSN Life Sciences Private Limited внешний вид субстанции описан как порошок от белого до желтовато-коричневого цвета, исследуемая в настоящей работе субстанция была желтовато-коричневой. В спецификации производителя Hetero Labs Limited – как порошок белого или почти белого цвета. Порошок этравирина Hetero Labs Limited представлял собой частицы почти белого цвета в соответствии с описанием в спецификации [1]. Формула этравирина приведена на рисунке 1.

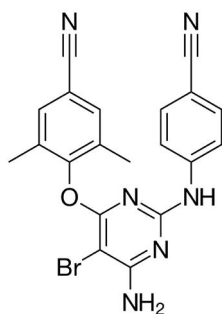


Рисунок 1. Структурная формула молекулы этравирина

Figure 1. Etravirine molecule chemical structure

Рентгеновская порошковая дифрактометрия. На рисунке 2 представлены результаты, полученные с помощью рентгеновской порошковой дифрактометрии. Из полученных результатов можно сделать вывод, что изученные субстанции представляют собой одинаковую полиморфную модификацию, так как наблюдаются пики при углах $8,8^\circ$, $9,1^\circ$, $13,0^\circ$, $19,4^\circ$, $19,6^\circ$, $23,6^\circ$, $26,5^\circ$, $26,8^\circ$, $28,5^\circ$. Исходя из данных [16], можно сделать вывод, что изученные субстанции относятся к форме I. Эта форма является высококристаллическим веществом, для повышения растворимости которой целесообразно применение соответствующей технологической обработки, например микронизации или получения твердой дисперсии.

Температура плавления. Установлено, что температура плавления этравирина находится в диапазоне $259\text{--}263^\circ\text{C}$, плавление сопровождается разложением. Результаты ДСК (рисунок 3) подтвердили эти

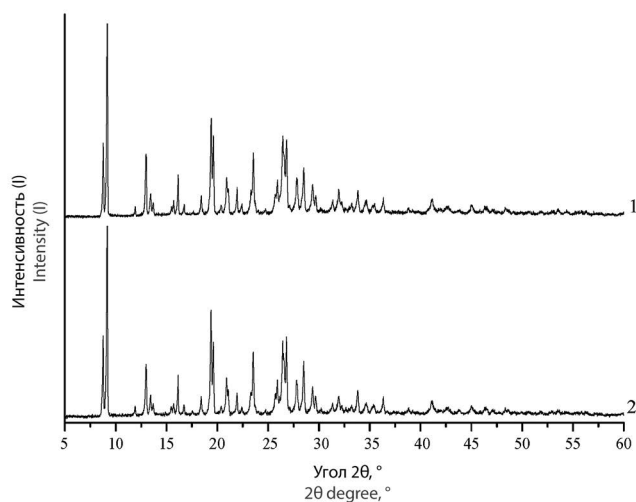


Рисунок 2. Дифрактограмма этравирина.

1 – субстанция MSN Life Sciences Private Limited; 2 – субстанция Hetero Labs Limited

Figure 2. Etravirine diffraction pattern.

1 – MSN Life Sciences Private Limited substance; 2 – Hetero Labs Limited substance

данные, температура начала процесса эндотермического перехода – $260,8^\circ\text{C}$, минимум эндотермического пика наблюдается при температуре $262,5^\circ\text{C}$. Затем наблюдался еще один пик, соответствующий разложению: температура начала – $268,5^\circ\text{C}$, максимум наблюдается при температуре $273,2^\circ\text{C}$.

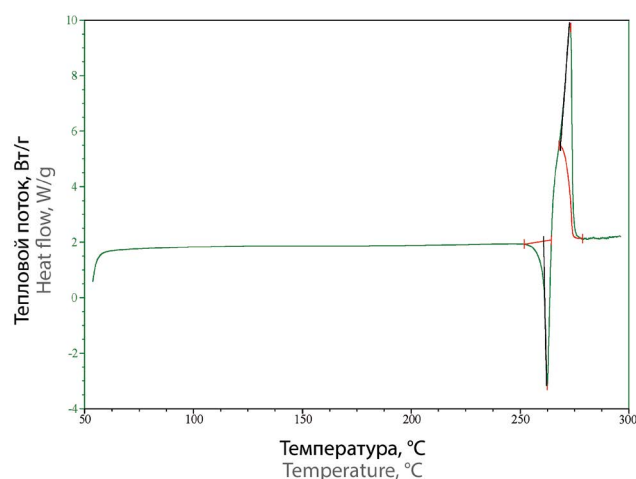


Рисунок 3. Термограмма ДСК субстанции этравирина

Figure 3. Etravirine substance diffraction pattern

Следовательно, при переработке субстанции возможно использование технологических процессов, протекающих при температуре до 250°C .

Растворимость. В таблице 1 представлены усредненные результаты изучения растворимости субстанции этравирина в водных средах с различным pH, полученные по трем повторностям эксперимента.

Таблица 1. Растворимость этравирина в водных средах с pH от 1,2 до 6,8 (относительное стандартное отклонение не превышает 3 %)

Table 1. Etravirine solubility in aqueous media with pH from 1.2 to 6.8 (RSD no more than 3 %)

Растворитель Solvent	Растворимость г на 100 мл раствора Solubility g per 100 ml of solution	pH раствора pH of solution	Интерпретация растворимости по ГФ РФ Interpretation of solubility according to the Russian State Pharmacopoeia
0,06 М HCl	$8,5 \cdot 10^{-8}$	1,2	практически нерастворим practically insoluble
Ацетатный буферный раствор (1,0 М $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$, 1,2 М CH_3COOH) Acetate buffer solution (1,0 М $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$, 1,2 М CH_3COOH)	$12,6 \cdot 10^{-8}$	4,5	практически нерастворим practically insoluble
Фосфатный буферный раствор (0,39 М Na_2HPO_4 , 0,02 М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) Phosphate buffer solution (0,39 М Na_2HPO_4 , 0,02 М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	$24,7 \cdot 10^{-8}$	6,8	практически нерастворим practically insoluble

Доказано, что в водных средах с физиологическим значением pH этравирин практически нерастворим. Растворимость – важная характеристика фармацевтической субстанции, которая [7–8] напрямую связана с биодоступностью и коррелируется с данными по всасываемости для субстанций, относящихся к II и IV классу БКС. Полученные результаты показывают необходимость улучшения растворимости этравирина для получения эффективного лекарственного препарата.

Усредненные результаты (получены по трем повторностям) растворимости этравирина в органических растворителях указаны в таблице 2.

Таблица 2. Растворимость этравирина в органических растворителях (относительное стандартное отклонение не превышает 3 %)

Table 2. Etravirine solubility in organic solvents (RSD no more than 3 %)

Растворитель Solvent	Растворимость г на 100 мл раствора Solubility g per 100 ml of solution	Интерпретация растворимости по ГФ РФ Interpretation of solubility according to the Russian State Pharmacopoeia
N,N-диметилформамид Dimethylformamide	42,233	легко растворим readily soluble
Диметилсульфоксид Dimethyl sulfoxide	37,449	легко растворим readily soluble
N,N-диметилацетамид Dimethylacetamide	31,435	легко растворим readily soluble
ТГФ THF	24,148	легко растворим readily soluble
ПЭГ-400 PEG-400	7,548	растворим soluble

Растворитель Solvent	Растворимость г на 100 мл раствора Solubility g per 100 ml of solution	Интерпретация растворимости по ГФ РФ Interpretation of solubility according to the Russian State Pharmacopoeia
2-Бутанон 2-Butanone	3,224	умеренно растворим sparingly soluble
Ацетон Acetone	2,592	умеренно растворим sparingly soluble
1-Метокси-2-пропанол 1-methoxy-2-propanol	2,040	умеренно растворим sparingly soluble
Этилацетат Ethyl acetate	1,067	умеренно растворим sparingly soluble
Дихлорметан Dichloromethane	0,603	мало растворим slightly soluble
Ацетонитрил Acetonitrile	0,313	мало растворим slightly soluble
Диэтиловый эфир Diethyl ether	0,188	мало растворим slightly soluble
Метиловый спирт Methanol	0,186	мало растворим slightly soluble
Этиловый спирт Ethanol	0,119	мало растворим slightly soluble
Пропиленгликоль Propylene glycol	0,092	очень мало растворим very slightly soluble
4-Метил-2-пентанон 4-Methyl-2-pentanone	0,090	очень мало растворим very slightly soluble
1-Октанол 1-Octanol	0,041	очень мало растворим very slightly soluble
Изопропиловый спирт Isopropyl alcohol	0,035	очень мало растворим very slightly soluble
Толуол Toluene	0,022	очень мало растворим very slightly soluble

Данные, приведенные в таблице 2, показывают, что этравирин обладает различной растворимостью в органических растворителях. Так, субстанция очень мало растворима в изопропиловом спирте и пропиленгликоле, мало растворима в часто используемом в фармацевтической технологии этиловом спирте. В то же время в большинстве полярных апротонных органических растворителей обе субстанции этравирина легко растворимы.

Липофильность фармацевтической субстанции имеет принципиальное значение, так как во многом определяет поведение молекулы в организме, его абсорбцию и фармакокинетику.

Результаты определения коэффициента распределения $\log P$ этравирина, установленные в системах «1-октанол/водный буферный раствор», представлены в таблице 3.

Таблица 3. Коэффициент распределения $\log P$ этравирина в системе растворителей «1-октанол/водный буферный раствор»

Table 3. Etravirine partition coefficient $\log P$ of a «1-octanol/buffer solution» solvent system

Водный раствор в системе растворителей Aqueous solution in a solvent system	$\log P$	pH раствора Solution pH
0,06 М HCl	5,68	1,2
Ацетатный буферный раствор (1,0 М $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$, 1,2 М CH_3COOH) Acetate buffer (1,0 М $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$, 1,2 М CH_3COOH)	5,51	4,5
Фосфатный буферный раствор (0,39 М Na_2HPO_4 , 0,02 М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) Phosphate buffer (0,39 М Na_2HPO_4 , 0,02 М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	5,22	6,8

Этравирин проявляет ярко выраженные липофильные свойства ($\log P > 5$) в интервале pH от 1,2 до 6,8.

Форма и размер частиц. Исследование с помощью ПЭМ показало, что частицы представляют собой игольчатые кристаллы призматической формы для обеих исследованных субстанций (рисунок 4).



Рисунок 4. Микрофотография образца этравирина.

1 – субстанция MSN Life Sciences Private Limited; 2 – субстанция Hetero Labs Limited

Figure 4. Etravirine sample micrograph.

1 – MSN Life Sciences Private Limited substance; 2 – Hetero Labs Limited substance

В таблице 4 представлены данные распределения частиц этравирина по размеру.

Таблица 4. Распределение частиц этравирина по размеру

Table 4. Etravirine particles size distribution

Производитель субстанции Substance manufacturer	d10, мкм d10, μm	d50, мкм d50, μm	d90, мкм d90, μm
MSN Life Sciences Private Limited substance	11,5	37,4	108
Hetero Labs Limited	1,06	3,02	10,4

Исходя из того, что 90 % частиц (d90) представлены кристаллами, имеющими форму вытянутых игольчатых призм длиной менее 108 мкм (субстанция MSN Life Sciences Private Limited) и менее 10,4 мкм (субстанция Hetero Labs Limited), этравирин обладает плохой сыпучестью, что согласуется с материалами работ [18–19]. Плохая сыпучесть может затруднять многие технологические процессы переработки порошков: таблетирование, растворение, смешивание и др., что необходимо учитывать при разработке технологических схем.

Спектрометрия в ИК-области. На инфракрасном спектре этравирина (рисунок 5) были получены следующие пики: валентные колебания N-H: 3481,8, 3377,5, 3344,8; валентные колебания CN: 2221,7; деформационные и скелетные колебания, область «отпечатков пальцев»: 1616,3, 1588,8, 1569,3, 1519,9, 1504,4, 1451,7, 1398,1, 1364,5, 1304,4, 1241,7, 1197,4, 1172,1, 1136,3, 1057,0, 1001,7, 882,1, 871,3, 829,6, 767,7 cm^{-1} . Данные значения также соотносятся с описанными в [16] для формы I.

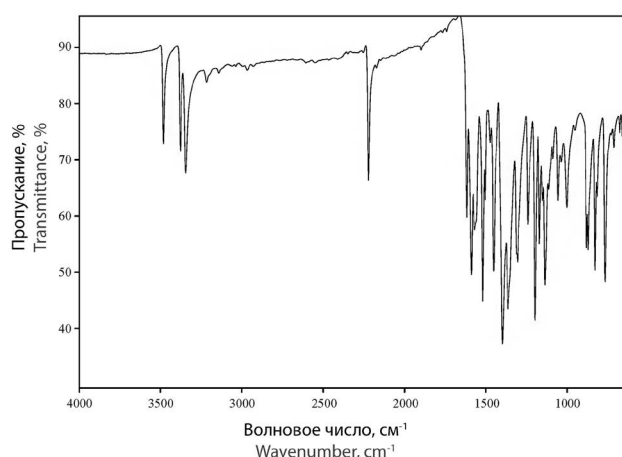


Рисунок 5. ИК-спектр этравирина

Figure 5. Etravirine IR spectrum

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 300 МГц): δ = 9,57 (s, 1H; протон вторичного амина); 7,74 (s, 2H; ароматические протоны); 7,55 (d-d, 4H; ароматические протоны); 7,11 (2H; протоны первичного амина); 2,12 (s, 6H; метильные протоны).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этравирин – липофильная, практически нерастворимая в водных растворах, растворимая в ряде органических растворителей субстанция, обладающая слабокислотными свойствами. Рентгеновская порошковая дифрактометрия показала, что исследованные субстанции (MSN Life Sciences Private Limited и Hetero Labs Limited) являются одной и той же полиморфной модификацией, характеризующейся пиками при углах 8,8°, 9,1°, 13,0°, 19,4°, 19,6°, 23,6°, 26,5°, 26,8°, 28,5°, что также было подтверждено спектрометрией в ИК-области. Субстанции представляют собой кристаллы призматической формы и обладают плохой сыпучестью. Частицы субстанции Hetero Labs Limited обладают меньшим размером (d₉₀): 10,4 мкм, в сравнении с частицами субстанции MSN Life Sciences Private Limited (d₉₀): 108 мкм. Температура плавления этравирин находится в диапазоне 259–263 °С, плавление сопровождается разложением, что исключает технологическую обработку при температурах выше 250 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report for Intellence. London: European Medicines Agency; 2008. 52 p.
2. Havens J.P., Podany A.T., Scarsi K.K., Fletcher C.V. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of etravirine: an updated review. *Clinical Pharmacokinetics*. 2020;59(2):137–154. DOI: 10.1007/s40262-019-00830-9.
3. Kiekens F. R. I., Voorspoels J. F. M., Baert L. E. C., inventors; Janssen Sciences Ireland UC, assignee. Process for preparing spray dried formulations of 4-[[6-amino-5-bromo-2-[(4-cyanophenyl)amino]-4-pyrimidinyl]oxy]-3,5-dimethylbenzonitrile. United States patent US9603803B2. 2017 Mar 16.
4. Tran P., Pyo Y.-C., Kim D.-H., Lee S.-E., Kim J.-K., Park J.-S. Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.
5. Huang S., O'Donnell K. P., de Vaux S. M. D., O'Brien J., Stutzman J., Williams R. O. Processing thermally labile drugs by hot-melt extrusion: The lesson with gliclazide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;119:56–67. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.014.
6. Rajput L., Sanphui P., Desiraju G. R. New solid forms of the anti-HIV drug etravirine: salts, cocrystals, and solubility. *Crystal Growth & Design*. 2013;13(8):3681–3690. DOI: 10.1021/cg4007058.
7. Bhatt-Mehta V., Hammoud H., Amidon G. L. A proposed pediatric biopharmaceutical classification system for medications for chronic diseases in children. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;152:105437. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105437.
8. Nyamba I., Lechanteur A., Semdé R., Evrard B. Physical formulation approaches for improving aqueous solubility and bioavailability of ellagic acid: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;159:198–210. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.11.004.
9. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. Step 5. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf. Accessed: 19.07.2021.
10. Золотов С. А., Демина Н. Б., Золотова А. С. Влияние водорастворимых полимеров фармацевтического качества на растворимость дарунавира и дарунавира этанолата. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(12):44–47. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-12-44-47.

11. Markovic M., Zur M., Ragatsky I., Cvijić S., Dahan A. BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1175. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121175.
12. Murakami T. Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine. *Expert opinion on drug discovery*. 2017;12(12):1219–1232. DOI: 10.1080/17460441.2017.1378176.
13. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 (ред. от 14.06.2018) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01418269/cncd_20072018_55. Ссылка активна на 19.07.2021.
14. Habyalimana V., Mbinze J. K., Yemoa A. L., Waffo C., Diallo T., Tshilombo N. K., Ntokamunda J.-L. K., Lebrun P., Hubert Ph., Marini R. D. Application of design space optimization strategy to the development of LC methods for simultaneous analysis of 18 antiretroviral medicines and 4 major excipients used in various pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;139:8–21. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.02.040.
15. Taylor K., Aulton M., editors. Aulton's Pharmaceutics. Amsterdam: Elsevier; 2017. 936 p.
16. Weuts I., Van Dycke F., Voorspoels J., De Cort S., Stokbroekx S., Leemans R., Brewster M. E., Xu D., Segmuller B., Turner Y. T. A., Roberts C. J., Davies M. C., Qi S., Craig D. Q. M., Reading M. Physicochemical Properties of the Amorphous Drug, Cast Films, and Spray Dried Powders to Predict Formulation Probability of Success for Solid Dispersions: Etravirine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(1):260–274. DOI: 10.1002/jps.22242.
17. Mao F., Kong Q., Ni W., Xu X., Ling D., Lu Z., Li J. Melting Point Distribution Analysis of Globally Approved and Discontinued Drugs: A Research for Improving the Chance of Success of Drug Design and Discovery. *ChemistryOpen*. 2016;5(4):357–368. DOI: 10.1002/open.201600015.
18. Azad M. A., Capellades G., Wang A. B., Klee D. M., Hammersmith G., Rapp K., Brancazio D., Myerson A. S. Impact of Critical Material Attributes (CMAs)-Particle Shape on Miniature Pharmaceutical Unit Operations. *AAPS PharmSciTech*, 2021;22(3):1–11. DOI: 10.1208/s12249-020-01915-6.
19. Wilson D., Bunker M., Milne D., Jawor-Baczynska A., Powell A., Blyth J., Streather D. Particle engineering of needle shaped crystals by wet milling and temperature cycling: Optimisation for roller compaction. *Powder Technology*. 2018;339:641–650. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.08.023.

REFERENCES

1. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report for Intellence. London: European Medicines Agency; 2008. 52 p.
2. Havens J. P., Podany A. T., Scarsi K. K., Fletcher C. V. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of etravirine: an updated review. *Clinical Pharmacokinetics*. 2020;59(2):137–154. DOI: 10.1007/s40262-019-00830-9.
3. Kiekens F. R. I., Voorspoels J. F. M., Baert L. E. C., inventors; Janssen Sciences Ireland UC, assignee. Process for preparing spray dried formulations of 4-[[6-amino-5-bromo-2-[(4-cyanophenyl)amino]-4-pyrimidinyl]oxy]-3,5-dimethylbenzonitrile. United States patent US9603803B2. 2017 Mar 16.
4. Tran P., Pyo Y.-C., Kim D.-H., Lee S.-E., Kim J.-K., Park J.-S. Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.
5. Huang S., O'Donnell K. P., de Vaux S. M. D., O'Brien J., Stutzman J., Williams R. O. Processing thermally labile drugs by hot-melt extrusion: The lesson with gliclazide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;119:56–67. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.014.

6. Rajput L., Sanphui P., Desiraju G. R. New solid forms of the anti-HIV drug etravirine: salts, cocrystals, and solubility. *Crystal Growth & Design*. 2013;13(8):3681–3690. DOI: 10.1021/cg4007058.
7. Bhatt-Mehta V., Hammoud H., Amidon G. L. A proposed pediatric biopharmaceutical classification system for medications for chronic diseases in children. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;152:105437. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105437.
8. Nyamba I., Lechanteur A., Semdé R., Evrard B. Physical formulation approaches for improving aqueous solubility and bioavailability of ellagic acid: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;159:198–210. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.11.004.
9. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. Step 5. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-11.pdf. Accessed: 19.07.2021.
10. Zolotov S. A., Demina N. B., Zolotova A. S. Influence of Water-Soluble Pharmaceutically Acceptable Polymers on the Solubility of Darunavir and Darunavir Ethanolate. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2020; 54(12): 44–47. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-12-44-47.
11. Markovic M., Zur M., Ragatsky I., Cvijić S., Dahan A. BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1175. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121175.
12. Murakami T. Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine. *Expert opinion on drug discovery*. 2017; 12(12): 1219–1232. DOI: 10.1080/17460441.2017.1378176
13. Reshenie Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 03.11.2016 № 78 (red. ot 14.06.2018) "O Pravilakh registratsii i ekspertizy lekarstvennykh sredstv dlya meditsinskogo primeneniya" [Eurasian Economic Commission Council Resolution No. 78 of 03 November 2016 (amended of 14 June 2018) "On the rules of marketing authorization and assessment of medicinal products for human use"]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01418269/cncd_20072018_55. Accessed: 19.07.2021. (In Russ.)
14. Habyalimana V., Mbinze J. K., Yemoa A. L., Waffo C., Diallo T., Tshilombo N. K., Ntokamunda J.-L. K., Lebrun P., Hubert Ph., Marini R. D. Application of design space optimization strategy to the development of LC methods for simultaneous analysis of 18 antiretroviral medicines and 4 major excipients used in various pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;139:8–21. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.02.040.
15. Taylor K., Aulton M., editors. Aulton's Pharmaceutics. Amsterdam: Elsevier; 2017. 936 p.
16. Weuts I., Van Dycke F., Voorspoels J., De Cort S., Stokbroekx S., Leemans R., Brewster M. E., Xu D., Segmuller B., Turner Y. T. A., Roberts C. J., Davies M. C., Qi S., Craig D. Q. M., Reading M. Physicochemical Properties of the Amorphous Drug, Cast Films, and Spray Dried Powders to Predict Formulation Probability of Success for Solid Dispersions: Etravirine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(1):260–274. DOI: 10.1002/jps.22242.
17. Mao F., Kong Q., Ni W., Xu X., Ling D., Lu Z., Li J. Melting Point Distribution Analysis of Globally Approved and Discontinued Drugs: A Research for Improving the Chance of Success of Drug Design and Discovery. *ChemistryOpen*. 2016;5(4):357–368. DOI: 10.1002/open.201600015.
18. Azad M. A., Capellades G., Wang A. B., Klee D. M., Hammersmith G., Rapp K., Brancazio D., Myerson A. S. Impact of Critical Material Attributes (CMAs)-Particle Shape on Miniature Pharmaceutical Unit Operations. *AAPS PharmSciTech*, 2021;22(3):1–11. DOI: 10.1208/s12249-020-01915-6.
19. Wilson D., Bunker M., Milne D., Jawor-Baczynska A., Powell A., Blyth J., Streather D. Particle engineering of needle shaped crystals by wet milling and temperature cycling: Optimisation for roller compaction. *Powder Technology*. 2018;339:641–650. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.08.023.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45>
УДК 615; 616.33; 616.34; 615.243



Оригинальная статья / Research article

Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного

О. Л. Сайбель*, А. И. Радимич, Т. Д. Даргаева, И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, И. А. Мартынчик

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

*Контактное лицо: Сайбель Ольга Леонидовна. E-mail: saybel@vilarii.ru

ORCID: О. Л. Сайбель – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>; А. И. Радимич – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>; Т. Д. Даргаева – <https://orcid.org/0000-0002-0722-9479>; И. А. Лупанова – <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>; Е. В. Ферубко – <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>; Е. Н. Курманова – <https://orcid.org/0000-0002-9243-5268>; И. А. Мартынчик – <https://orcid.org/0000-0001-7081-5545>.

Статья поступила: 07.09.2021

Статья принята в печать: 17.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) широко используется в традиционной медицине различных стран при заболеваниях печени, а также является объектом фармакологических исследований гепатопротекторной активности. В связи с этим во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений разработан способ получения сухого экстракта из травы дикорастущего цикория (ЭТДЦ).

Цель. Цель исследования – определение качественного состава фенольных соединений, выявление веществ, преобладающих в ЭТДЦ, и проведение фармакологического скрининга исследуемого экстракта.

Материалы и методы. Химический состав ЭТДЦ изучали с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, количественное определение основных компонентов проводили методом ВЭЖХ-УФ с использованием индивидуальных соединений, выделенных нами ранее и идентифицированных методом ЯМР-спектроскопии. Проведение фармакологического скрининга гепатопротективной активности ЭТДЦ проводили на 50 крысах-самцах. Острый токсический гепатит у животных вызывали однократным подкожным введением 50 % масляного раствора тетрахлорметана (ТХМ) в дозе 0,4 мл на 100 г массы тела. За час до введения ТХМ животные получали ЭТДЦ в дозах 100 или 500 мг/кг. Через 48 часов после введения ТХМ определяли активность сывороточных ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание общего билирубина для предварительного установления фармакологической активности. Патоморфологические исследования печени проводили с использованием гистологических методик. Гистологическое строение печени оценивали, используя срезы печени, окрашенные гематоксилином и эозином.

Результаты и обсуждение. Компонентный состав ЭТДЦ представлен оксикумаринами, гидроксикоричными кислотами и флавоноидами. Доминирующими фенольными соединениями являются эскулетин, цикориин, цикориевая, хлорогеновая и кафтаровая кислоты. В условиях острого экспериментального токсического гепатита было установлено, что предварительное введение ЭТДЦ снижает вызванное ТХМ токсическое действие на клетки печени. У животных, получавших ЭТДЦ в дозах и 100 мг/кг, и 500 мг/кг, наблюдалось снижение активности АЛТ на 35 и 45 %, АСТ – на 15 и 28 %, щелочной фосфатазы – на 15 и 21 %; содержание общего билирубина – на 20 и 29 % соответственно по сравнению с аналогичными показателями у группы животных, не получавших экстракт. Гистологическое исследование показало, что введение ЭТДЦ животным в дозах 100 и 500 мг/кг уменьшает дистрофические изменения гепатоцитов, этот эффект более выражен при дозе 500 мг/кг экстракта.

Заключение. Основными компонентами ЭТДЦ являются оксикумарины (эскулетин, цикориин) и гидроксикоричные кислоты (цикориевая, хлорогеновая и кафтаровая). По результатам скрининговых исследований установлено, что ЭТДЦ в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг является перспективным объектом для дальнейшего фармакологического исследования.

Ключевые слова: цикорий обыкновенный, экстракт, ВЭЖХ-МС/МС, гидроксикоричные кислоты, оксикумарины, фармакологический скрининг

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

Вклад авторов. О. Л. Сайбель, Т. Д. Даргаева спланировали и разработали эксперимент. А. И. Радимич интерпретировал результаты ВЭЖХ-МС/МС-исследования химического состава экстракта. И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко спланировали фармакологическое исследование экстракта. Е. Н. Курманова, И. А. Мартынчик проводили эксперимент на модели токсического гепатита и обрабатывали его результаты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Финансирование. Исследования выполнены в рамках реализации плана научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме № FNSZ-2019-0010 «Поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из растительного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм» и № FNSZ-2019-0009 «Проведение доклинических исследований отдельных фракций, субстанций и лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья».

Для цитирования: Сайбель О. Л., Радимич А. И., Даргаева Т. Д., Лупанова И. А., Ферубко Е. В., Курманова Е. Н., Мартынчик И. А. Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):36–45. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45>

Phenolic Compounds and Hepatoprotective Activity of Chicory Herb Extract

Olga L. Saybel, Andrey I. Radimich, Tamara D. Dargaeva, Irina A. Lupanova, Ekaterina V. Ferubko, Elena N. Kurmanova, Irina A. Martynchik

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1, Greena str., Moscow, 117216, Russia

*Corresponding author: Olga L. Saybel. E-mail: saybel@vilarnii.ru

ORCID: Olga L. Saybel – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>; Andrey I. Radimich – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>; Tamara D. Dargaeva – <https://orcid.org/0000-0002-0722-9479>; Irina A. Lupanova – <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>; Ekaterina V. Ferubko – <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>; Elena N. Kurmanova – <https://orcid.org/0000-0002-9243-5268>; Irina A. Martynchik – <https://orcid.org/0000-0001-7081-5545>.

Received: 07.09.2021

Revised: 17.11.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is widely applied for liver disease treatment by traditional medicine of different countries; as well, it is the object for pharmacological research of hepatoprotective activity. In this regard, the method for obtaining dry extract of wild chicory herb (WCHE) is developed in the All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants.

Aim. Aim of the research is determination of the qualitative composition of phenolic compounds, identification of the substances prevailing in WCHE and conducting pharmacological screening of the extract.

Materials and methods. WCHE chemical composition has been explored with HPLC-MS/MS method; the main components were determined quantitatively with HPLC-UF method using single compounds that were isolated by us earlier and identified by NMR spectroscopy. WCHE pharmacological screening of hepatoprotective activity research was involving 50 male rats. Acute toxic hepatitis in animals was induced by a single subcutaneous injection of 50 % oily solution of tetrachloromethane (TCM) at a dosage of 0.4 ml per 100 g body weight. One hour before administration TCM, animals received WCHE at the doses of 100 or 500 mg/kg. 48 hours after TCM administration, the activity of serum enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), as well as the content of total bilirubin were determined for preliminary establishment of pharmacological activity. Pathomorphological studies of rat liver were carried out using histological methods. The liver histological structure was inspected using liver sections stained with hematoxylin and eosin.

Results and discussion. The component composition of WCHE is represented by oxycoumarins, hydroxycinnamic acids and flavonoids. The dominant phenolic compounds are esculetin, chicoriin, chicoric, chlorogenic and caftaric acids. It was found under acute experimental toxic hepatitis, that preliminary WCHE administration reduces the toxic TCM effect on liver cells. In animals treated with WCHE at doses both 100 mg/kg and 500 mg/kg body weight, it was observed decreases in ALT activity by 35 % and 45 %, AST by 15 % and 28 %, alkaline phosphatase by 15 % and 21 %; the content of total bilirubin by 20 % and 29 %, respectively, in comparison with similar indicators in the group of animals that were not treated with the extract. The histological study showed that WCHE administration to animals at the doses of 100 and 500 mg/kg reduces dystrophic changes in hepatocytes, this effect is more pronounced at the extract dosage of 500 mg/kg.

Conclusion. Main WCHE components are oxycoumarins (esculetin, chicoriin), hydroxycinnamic acids (chicoric, chlorogenic and caftaric). According to the results of screening studies, it was established that WCHE in doses of 100 mg/kg and 500 mg/kg is a promising object for further pharmacological research.

Keywords: chicory, extract, HPLC-MS/MS, hydroxycinnamic acids, oxycoumarins, pharmacological screening

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

Contribution of the authors. Olga L. Saybel, Tamara D. Dargaeva planned and developed an experiment. Andrey I. Radimich interpreted the results of HPLC-MS/MS studies of the chemical composition of the extract. Irina A. Lupanova, Ekaterina V. Ferubko planned a pharmacological study of the extract. Elena N. Kurmanova, Irina A. Martynchik conducted an experiment on a model of toxic hepatitis and processed its results. All authors participated in the discussion of the results and writing of the article.

Funding. The studies were carried out as part of the implementation of the research plan of the Federal State Budgetary Scientific Institution VILAR on the topic No. FNSZ-2019-0010 "Search for active fractions of natural compounds, development of methods for their production from plant raw materials, standardization methods and the creation of modern dosage forms on their basis" and No. FNSZ- 2019-0009 "Conducting preclinical studies of individual fractions, substances and medicinal products from medicinal plant materials."

For citation: Saybel O. L., Radimich A. I., Dargaeva T. D., Lupanova I. A., Ferubko E. V., Kurmanova E. N., Martynchik I. A. Phenolic compounds and hepatoprotective activity of chicory herb extract. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):36–45. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45>

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные гепатиты, метаболические нарушения (диабет, ожирение и др.), несбалансированное питание, неоправданный прием лекарственных средств, динамичный образ жизни современного человека в условиях неблагоприятной окружающей среды могут служить факторами развития хронических заболеваний печени. Данное понятие в клиническом контексте описывает патологические процессы, приводя-

щие, при отсутствии лечения, к прогрессирующему разрушению гепатоцитов. Среди различных форм хронических заболеваний печени наиболее распространенными являются вирусные гепатиты, алкогольная или неалкогольная жировая болезнь печени, аутоиммунный гепатит, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома [1–3].

Несмотря на то, что за последние несколько десятилетий был достигнут значительный прогресс в открытии методов и поиска средств лечения хрони-

ческих заболеваний печени, разработка новых лекарственных препаратов, способствующих нормализации работы печени, остается актуальной.

Особого внимания в решении этого вопроса заслуживает опыт народной и традиционной медицины разных стран, основанный преимущественно на применении средств растительного происхождения [4]. Вместе с тем опубликованные данные научной литературы, основанные на результатах изучения экстрактов и биологически активных веществ (БАВ) растений в опытах *in vitro* и *in vivo* подтверждают эффективность растительных средств при хронических заболеваниях печени [5–7], что указывает на целесообразность исследований, направленных на детальное изучение растений, и разработку на их основе гепатопротективных средств.

Одним из перспективных объектов отечественной флоры является многолетнее травянистое растение семейства Астровые (*Asteraceae*) цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.). Данный вид широко известен своим многоцелевым использованием. Культивируемые сорта «корневого» цикория выращиваются на плантациях в промышленных масштабах с целью производства «заменителя кофе», а также получения пребиотика инулина. Надземная часть обладает высокой пищевой ценностью, поэтому специально выведенные сорта цикория применяется для обогащения рациона домашних животных на пастбищах. Листовые сорта используется в пищу в виде салата [8].

Анализ данных литературы электронной медицинской библиотеки Pub Med, базы данных Google scholar показал, что цикорий обыкновенный рассматривается зарубежными учеными в качестве источника получения БАВ гепатопротективного действия [8–11].

Так, антиоксидантный механизм защиты печени экстракта листьев цикория был показан в исследовании на модели окислительного стресса печени, вызванного метотрексатом [12, 13]. Гепатопротективные свойства экстракта листьев также подтверждены на модели токсического гепатита в работах A. Jamshidzadeh et al. и A. L. Al-Malki et al. [14, 15]. В эксперименте на 40 крысах-самцах в составе комплексного средства экстракт цикория улучшил липидный профиль и снижал активность ферментов печени на фоне высокожировой диеты [16]. Аналогичные данные были получены при исследовании экстракта семян цикория [17].

A. N. Gilani et al. исследовали водно-метанольный экстракт семян цикория на гепатопротекторную активность в отношении вызванного ацетаминофеном и четыреххлористым углеродом поражения печени у мышей. Авторами было отмечено снижение смертности животных, а также снижение уровня сывороточных ферментов: щелочной фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) [18]. На основании биохимических анализов и

гистологических исследований антигепатотоксическая активность установлена для экстракта корней и корневых каллусов [19]. С. Г. Крыловой с соавт. показано, что гепатопротекторная активность экстракта корней цикория превосходит препарат Карсил® [20].

Во всех вышеописанных исследованиях экстракты цикория были получены из культивируемых растений. Учитывая, что на территории Российской Федерации цикорий обыкновенный имеет довольно обширный ареал распространения в дикорастущем виде и значительные сырьевые ресурсы, нами в качестве объекта исследования выбрана надземная часть (травы) именно таких растений.

На основе травы дикорастущего цикория в ФГБНУ ВИЛАР разработан способ получения сухого экстракта (ЭТДЦ) и установлены его иммуномодулирующая, антиоксидантная и противовоспалительная активность [21].

Целью настоящей работы явилось изучение качественного состава фенольных соединений, выявление доминирующих веществ ЭТДЦ и проведение его фармакологического скрининга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сухой экстракт цикория обыкновенного получен из травы дикорастущего цикория обыкновенного, заготовленного в фазу цветения в Рыбновском районе Рязанской области в 2019 году. Способ получения экстракта включает стадию экстракции сырья 70%-м спиртом, концентрирования полученных извлечений, очистку от липофильных соединений и сушку. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту в экстракте составляет $8,1 \pm 0,37$ %.

Метаболический профиль ЭТДЦ исследовали методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС с использованием системы LCMC-8040 (Shimadzu, Япония), включающей ультраэффективный жидкостной хроматограф Nexera и тройной квадрупольный масс-спектрометр (ионизация – электроспрей (ESI), сканирование масс в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов в диапазоне 100–1000 m/z, напряжение на капилляре источника ионизации 5 кВ, температура нагревательного блока 400 °С, поток азота (газа осушителя) 20 л/мин), а также диодно-матричный детектор. Хроматографирование проводили на колонке Luna 5 µm C18 100 Å (250 × 4,6 мм). Температура термостатирования колонки 30 °С. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Объем инъекции испытуемого раствора составлял 10 мкл. Подвижная фаза: система растворителей 0,2%-й раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В) в градиентном режиме элюирования (0–20 мин – 10 % В, 20–30 мин – 10–25 % В, 30–40 мин – 40 % В, 40–44 мин – 60 % В, 44–48 мин – 80 % В, 48–60 мин – 10 % В). Идентификацию веществ проводили на основании характеристик УФ- и масс-спектров, их сопоставлением с данными литературы,

а также сравнением с ранее выделенными нами индивидуальными соединениями [22–25].

Количественное определение цикориевой, хлорогеновой, каftarовой кислот, эскулетина и цикориина проводили методом ВЭЖХ-УФ на хроматографе Prominence-i LC-2030C 3D (Shimadzu, Япония) в описанных выше условиях. В качестве стандартных образцов (чистота не менее 98 %) были использованы индивидуальные вещества, выделенные нами ранее из надземной части цикория обыкновенного и идентифицированные методом ЯМР-спектроскопии.

Фармакологические исследования ЭТДЦ выполняли согласно Решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики ЕАЭС в сфере обращения лекарственных средств», национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [26]. Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

Скрининговые фармакологические исследования ЭТДЦ проводили на модели токсического гепатита, индуцированного тетрахлорметаном (ТХМ), на 50 нелинейных крысах-самцах с исходной массой тела 200–250 г. Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Перед началом эксперимента животные находились на карантине 14 дней. Опытные животные были разделены на пять групп по 10 особей: первая – интактные животные; вторая – контрольные животные, которым перед введением ТХМ пять дней вводили эквивалентное количество 1%-го крахмального клейстера в аналогичном с опытными группами режиме внутривенно через зонд. Третья и четвертая группы – опытные, которые до введения тетрахлорметана получали ЭТДЦ пять дней в дозах 100 и 500 мг/кг, суспендированный в 1%-ом крахмальном клейстере соответственно. Пятая группа животных получала препарат сравнения – Силимар®

(таблетки 100 мг, АО «Фармцентр ВИЛАР»), в дозе 100 мг/кг, также суспендированный в 1%-м крахмальном клейстере в течение пятидневного срока.

Острый токсический гепатит у животных вызывали однократным введением подкожно 50 % масляного раствора ТХМ (ООО «Компонент-Реактив», Россия) в дозе 0,4 мл на 100 г, через час после последнего введения исследуемых веществ. Через 48 часов после введения тетрахлорметана проводили взятие крови из хвостовой вены крыс. На биохимическом анализаторе CS-T240 (Dirui, Китай) определяли активность сывороточных ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), а также содержание общего билирубина для предварительного установления фармакологической активности. Патоморфологические исследования печени крыс проводили с использованием гистологических методик. Гистологическое строение печени оценивали при окраске срезов печени гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием лицензионного пакета программ статистического анализа Statistica 13 (StatSoft, США). Для оценки значимости различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический t-критерий Стьюдента, для ненормального распределения – U-критерий Манна – Уитни. Вычисляли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). Различия между сравниваемыми значениями считали достоверными при уровне вероятности 95 % и более ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение хроматографического профиля ЭТДЦ методом ВЭЖХ-МС/МС показало, что основными его метаболитами являются оксикумарины, фенолокислоты – производные гидроксикоричной кислоты и флавоноиды. Среди доминирующих соединений идентифицированы эскулетин, цикориин, цикориевая, хлорогеновая и каftarовая кислоты (рисунки 1).

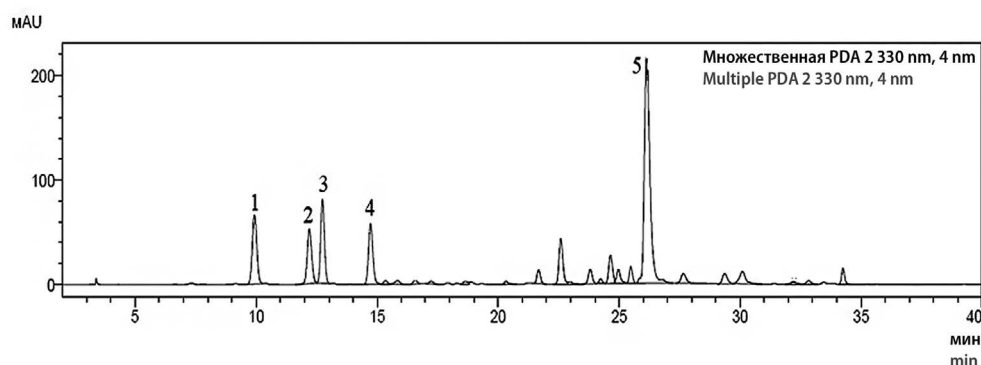


Рисунок 1. ВЭЖХ-УФ-хроматограмма (330 нм) ЭТДЦ:

1 – эскулетин; 2 – хлорогеновая кислота; 3 – каftarовая кислота; 4 – цикориин; 5 – цикориевая кислота

Figure 1. HPLC-UV-chromatogram (330 nm) WCHE:

1 – esculetin; 2 – chlorogenic acid; 3 – caftaric acid; 4 – chicoriin; 5 – chicoric acid

Характеристика и содержание основных компонентов исследуемого экстракта представлено в таблице 1.

Для первичного отбора потенциальных гепатопротекторов ЭТДЦ использована модель токсического гепатита, индуцированная четыреххлористым углеродом. При попадании в организм ТХМ (CCl_4) под действием системы цитохрома P_{450} , расположенной в эндоплазматическом ретикулуле гепатоцитов, превращает его в реакционноспособное промежуточное соединение, трихлорметильный радикал ($\text{CCl}_3\cdot$), который быстро реагирует с кислородом с образованием высокореактивного гепатотоксичного трихлорметилпероксирадикала, а затем пероксирадикала. Результатом такого воздействия является взаимодействие метаболитов ТХМ с полиненасыщенными жирными кислотами и развития цепной реакции, ведущей к перекисному окислению липидов или ковалентному связыванию с липидами и белками, что, в свою очередь, ведет к разрушению клеточных мембран гепатоцитов [27]. Нарушение целостности клеток печени приводит к высвобождению ферментов, таких как

АСТ, АЛТ, ЩФ, а также нарушению захвата билирубина, уровень которых соответственно в крови повышается. В связи с этим снижение концентрации данных ферментов и билирубина под действием лечебных средств служит свидетельством их гепатопротекторного действия [28].

Результаты изучения влияния ЭТДЦ на активность маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс представлены в таблице 2.

Профилактическое введение ЭТДЦ в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг дозозависимо снижало активность АЛТ на 35 и 45 % соответственно, АСТ – на 15 и 28 %, ЩФ – на 15 и 21 %, содержание общего билирубина – на 20 и 29 % в сыворотке крови крыс по сравнению с аналогичными показателями у животных с нелеченным экспериментальным гепатитом II группы. Биохимические показатели крови крыс IV группы, получавших ЭТДЦ в дозе 500 мг/кг, были ниже, чем у крыс V группы, которым вводили препарат сравнения Силимар®, 100 мг/кг.

Морфологическое строение образцов печени, полученной от крыс интактной группы I, соответствова-

Таблица 1. Основные биологически активные вещества ЭТДЦ

Table 1. The main biologically active substances of WCHE

Время удерживания, мин Retention time, min	Вещество Substance	λ_{max} , нм λ_{max} , nm	Молекулярная масса, Da Molecular weight, Da	Положительная ионизация, m/z фрагменты Positive ionization, m/z fragments	Отрицательная ионизация, m/z фрагменты Negative ionization, m/z fragments	Содержание, % ($M \pm \text{RSD}$, $n = 3$) Content, % ($M \pm \text{RSD}$, $n = 3$)
10,24	Цикориин Chicoriin	289 340	340	179 (эскулетин) 179 (esculetin) 341 [M + H] ⁺ 363 [M + Na] ⁺ 681 [2M + H] ⁺ 703 [2M + Na] ⁺	177 (эскулетин) 177 (esculetin) 339 [M – H] [–] 679 [2M – H] [–]	1,44 ± 0,05
13,15	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid	217 325	354	163 (кофейная кислота – H ₂ O) 181 (кофейная кислота) 163 (caffeic acid – H ₂ O) 181 (caffeic acid) 355 [M + H] ⁺ 377 [M + Na] ⁺ 731 [2M + Na] ⁺	191 (хинная кислота) 191 (quinic acid) 353 [M – H] [–] 707 [2M – H] [–]	1,77 ± 0,06
13,50	Кафтаровая кислота Caftaric acid	329	312	313 [M + H] ⁺ 330 [M + H ₂ O] ⁺ 335 [M + Na] ⁺	149 (винная кислота) 179 (кофейная кислота) 149 (tartaric acid) 179 (caffeic acid) 311 [M – H] [–] 357 [M + HCOOH] [–]	0,20±0,01
15,00	Эскулетин Esculetin	297 345	178	179 [M + H] ⁺ 201 [M + Na] ⁺ 379 [2M + Na] ⁺	177 [M – H] [–] 355 [2M – H] [–]	0,44 ± 0,14
28,00	Цикориевая кислота Chicoric acid	329	474	163 (кофейная кислота – H ₂ O) 181 (кофейная кислота) 163 (caffeic acid – H ₂ O) 181 (caffeic acid) 475 [M + H] ⁺ 492 [M + H ₂ O] ⁺ 497 [M + Na] ⁺ 971 [2M + Na] ⁺	293 [M – кофейная кислота – H ₂ O] [–] 311 [M – кофейная кислота] [–] 293 [M – caffeic acid – H ₂ O] [–] 311 [M – caffeic acid] [–] 473 [M – H] [–] 947 [2M – H] [–]	2,90 ± 0,09

Таблица 2. Сравнительные исследования биохимических показателей крови крыс, получавших ЭТДЦ и препарат сравнения Силимар® ($M \pm m$), $n = 10$

Table 2. Comparative studies of the biochemical parameters of the blood of rats treated with WCNE and the reference drug Silimar® ($M \pm m$), $n = 10$

Группы животных Animal groups	Биохимических показателей крови крыс							
	АЛТ, Е/л ALT, E/I	%	АСТ, Е/л AST, E/I	%	ЩФ, Е/л ALP, E/I	%	Билирубин общ., мкмоль/л Bilirubin total μmol/l	%
Интактные Intact	64,06 ± 5,45	–	89,58 ± 6,42	–	321,00 ± 6,80	–	1,30 ± 0,12	–
Контроль (модель тетрахлорметанового гепатита) Control (carbon tetrachloride hepatitis model)	202,60 ± 5,42	100	189,60 ± 3,91	100	569,00 ± 5,50	100	1,94 ± 0,04*	100
ЭТДЦ, доза 100 мг/кг + модель тетрахлорметанового гепатита ETDC, dose 100 mg/kg + model of carbon tetrachloride hepatitis	131,70 ± 1,63*	65	160,40 ± 4,10*	85	483,70 ± 4,90*	85	1,62 ± 0,10	80
ЭТДЦ, 500 мг/кг + модель тетрахлорметанового гепатита ETDC, 500 mg/kg + carbon tetrachloride hepatitis model	111,40 ± 4,00*	55	136,50 ± 2,67*	72	449,50 ± 4,51*	79	1,36 ± 0,06*	71
Силимар®, 100 мг/кг + модель тетрахлорметанового гепатита Silimar®, 100 mg/kg + carbon tetrachloride hepatitis model	135,80 ± 6,60*	67	161,20 ± 2,39*	85	489,40 ± 8,06*	86	1,62 ± 0,04*	83,5

Примечание. * Достоверность различий по сравнению с контролем (модель патологии) при $p < 0,05$.

Note. * Reliability of differences compared with control (pathology model) at $p < 0.05$.

ло гистологической норме. Введение тетрахлорметана вызывало дистрофические изменения по типу гиалиново-капельной дистрофии (рисунок 2).

Введение ЭТДЦ в дозах 100 и 500 мг/кг уменьшало дистрофические изменения гепатоцитов, при этом эффект был более выражен при введении максимальной дозы экстракта (рисунок 3).

В печени крыс V группы, получавших препарат сравнения Силимар® (100 мг/кг), выявлены аналогичные дистрофические изменения гепатоцитов, что и в группе III – ЭТДЦ в дозе 100 мг/кг (рисунок 4).

Оценивая морфологическую структуру печени крыс III и IV групп, установлено, что Силимар® в дозе 100 мг/кг проявляет гепатопротекторную активность.

На основании результатов патогистологических исследований показано, что экстракт цикория в дозах 100 и 500 мг/кг проявляет дозозависимую гепатопротективную активность, сравнимую с аналогичным действием известного гепатопротекторного препарата Силимар®.

Таким образом, экстракт травы цикория обыкновенного в дозах 100 и 500 мг/кг по результатам скри-

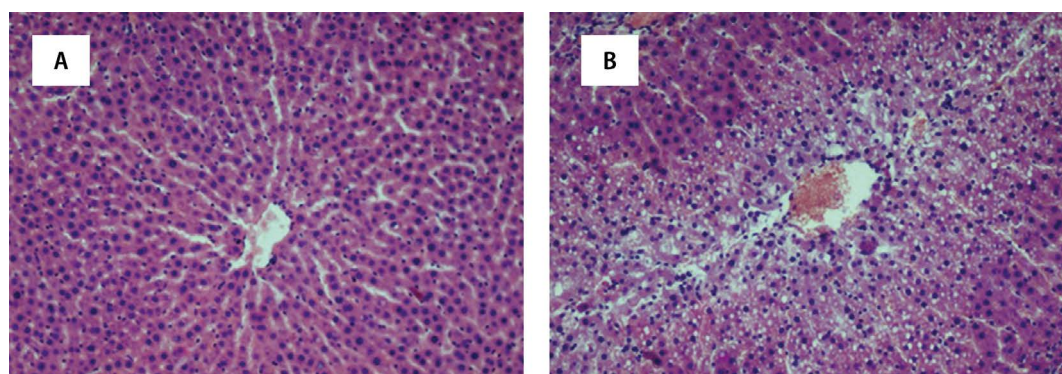


Рисунок 2. Морфологическое строение печени интактных крыс (А) и крыс с ТХМ гепатитом (В). Здесь и далее препараты окрашивали гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$

Figure 2. Morphological structure of the liver of intact rats (A) and rats with TCM-hepatitis model (B). Hereinafter, preparations were stained with hematoxylin and eosin, magnification $\times 100$

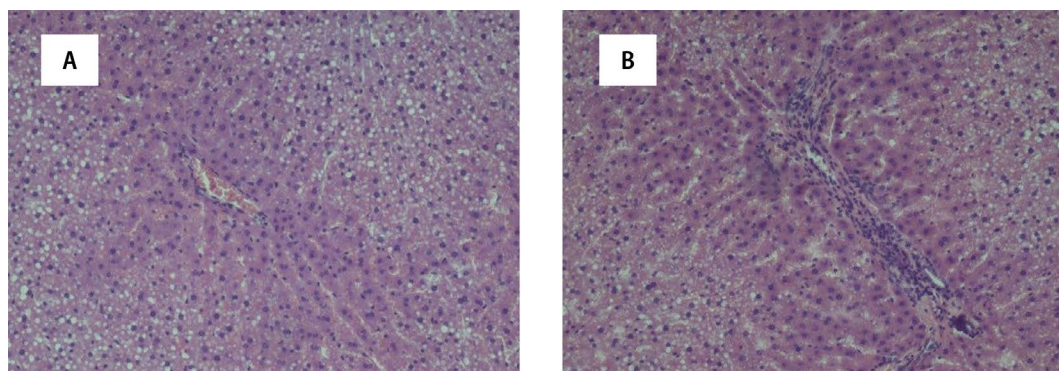


Рисунок 3. Морфологическое строение печени крыс, получавших ЭТДЦ в дозах 100 мг/кг (А) и 500 мг/кг (В), модель ТХМ гепатита
Figure 3. Morphological structure of the liver of rats treated with ETDC at doses of 100 mg/kg (A) and 500 mg/kg (B), TCM-hepatitis model

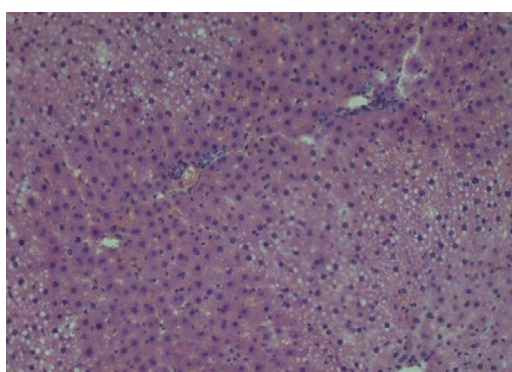


Рисунок 4. Морфологическое строение печени крыс, получавших Силимар® в дозе 100 мг/кг, модель ТХМ гепатита
Figure 4. Morphological structure of the liver of rats treated with Silimar® at a dose of 100 mg / kg, TCM-hepatitis model

нингового исследования в условиях модели острого тетрахлорметанового гепатита является перспективным объектом для дальнейшего фармакологического изучения, что согласуется с ранее полученными данными на модели острого токсического поражения печени крыс, вызванного однократным подкожным введением сулемы в дозе 3 мг/кг [29].

Безусловно, гепатопротективное действие ЭТДЦ обусловлено активностью комплекса БАВ исследуемого экстракта. Однако основополагающая роль в обеспечении данного действия принадлежит доминирующим его компонентам – оксикумаринам и гидроксикоричным кислотам. В литературе описаны результаты фармакологических исследований эскулетина и гидроксикоричных кислот, подтверждающих их гепатопротективную активность.

Так, в работе А.Н. Gilani et al. было показано, что предварительное введение эскулетина (6 мг/кг) снижало показатель смертности мышей до 40 % по сравнению со 100%-м контролем и предотвращала индуцированное парацетамолом (640 мг/кг) и ТХМ повышение сывороточных ферментов ЩФ, АСТ и АЛТ. Наряду с этим выявлено, что эскулетин пред-

отвращает вызванное гепатотоксической дозой ТХМ (1,5 мл/кг; перорально) удлинение времени фенобарбиталового сна, подтверждая тем самым гепатопротекторную активность [30].

Эскулетин, обладая ингибирующим действием на ксантиноксидазу, уровень которой повышается при гепатите и интоксикации печени, оказывает антигепатотоксическое действие. Аналогичным действием обладает и кофейная кислота, фрагменты которой являются частью структуры кислот (цикориевой, хлорогеновой и кафтаровой), входящих в состав ЭТДЦ [31]. Также эскулетин проявляет подавляющую активность в отношении окислительного повреждения ДНК [32].

W. L. Lin et al. в опытах *in vitro* подтвердили, что эскулетин в дозах 5–20 мкг/мл значительно снижал выход лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и АЛТ, а также уменьшал образование малонового диальдегида в первичных культивируемых гепатоцитах крыс, вызванное 30-минутной обработкой короткоцепочечного аналога гидропероксида липидов *трет*-бутилгидропероксида (t-BHP). Наряду с этим исследование *in vivo* на крысах показало, что предварительная обработка эскулетином (внутрибрюшинно) в концентрациях 0,5 и 5 мг/кг в течение 5 дней перед однократной внутрибрюшинной дозой t-BHP (0,1 ммоль/кг) значительно снижала уровни АЛТ и АСТ и окислительного стресса в печени. Гистопатологическая оценка свидетельствовала, что эскулетин снижает разрыв гепатоцитов, инфильтрацию лейкоцитов и некроз печени [33].

Антиокислительный эффект эскулетина в опытах *in vitro* подтвержден S. H. Kim et al. в отношении повреждения фибробластов, вызванного H_2O_2 [34], а также в исследовании M. J. Lee et al. на липопро-теидах низкой плотности [35].

Цикориин, являясь гликозидом эскулетина, под действием кислой среды желудка наиболее вероятно будет подвергаться гидролизу с образованием агликона и, соответственно, проявлять все описанные выше эффекты эскулетина.

Наряду с оксикумаринами, доминирующими компонентами ЭТДЦ, являются гидроксикоричные кислоты. Цикориевая кислота преобладает в ЭТДЦ по сравнению с другими метаболитами этой группы и, предположительно, вносит значительный вклад в гепатопротекторное действие экстракта. По мнению зарубежных авторов в основе механизма защитного действия данного соединения лежит антиоксидантная активность [36, 37]. В эксперименте на модели стеатоза печени, вызванного этанолом, также было показано, что цикориевая кислота при пероральном введении в дозе 4 мг/кг способна ослаблять острый алкогольный стеатоз у мышей, препятствуя индукции индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и iNOS-зависимых сигнальных каскадов в печени [38].

Структура цикориевая кислота, как и других производных оксикоричной кислоты, содержит виниленовый мостик, соединяющий карбоксильную группу с ароматическим кольцом, что характеризует такие соединения более высокой антиоксидантной активностью, чем соответствующие производные бензойной кислоты. Проявлению значительной активности также способствует стабилизация феноксилов, образуемых оксикоричными кислотами, за счет делокализации неспаренного электрона на виниленовый фрагмент [39].

Поскольку используемая экспериментальная модель тетрахлорметанового гепатита имеет окислительный механизм разрушения гепатоцитов, то выявленный гепатопротекторный эффект экстракта, предположительно, обусловлен именно предотвращением окислительного стресса посредством антиоксидантной активности его метаболитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, доминирующими метаболитами экстракта травы цикория обыкновенного являются оксикумарины (эскулетин, цикориин), а также гидроксикоричные кислоты (цикориевая, хлорогеновая и каftarовая).

В результате проведенного фармакологического скрининга установлено, что экстракт травы цикория дикорастущего в дозах 100 и 500 мг/кг является перспективным объектом для дальнейшего изучения и создания на его основе гепатопротекторного средства растительного происхождения.

Опубликованные результаты исследований других ученых позволяют предположить, что реализация механизмов гепатопротекторного действия экстракта травы дикорастущего цикория обусловлена фенольными соединениями, обладающими выраженными антиоксидантными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vong S., Bell B. P. Chronic liver disease mortality in the United States, 1990–1998. *Hepatology*. 2004;39(2):476–483. DOI: 10.1002/hep.20049.
2. Gilani A. H., Janbaz K. H. Evaluation of the liver protective potential of *Cichorium intybus* seed extract on Acetaminophen and CCl₄-induced damage. *Phytomedicine*. 1994;1(3):193–197. DOI: 10.1016/S0944-7113(11)80064-4.
3. Рейзис А. П., Борзакова С. Н., Аксенова В. А. Лекарственно-индуцированные поражения печени – актуальная проблема современной медицины. *Гастроэнтерология*. 2010;3:49–54.
4. Akbarzadeh T., Sabourian R., Saeedi M., Rezaeizadeh H., Khanavi M., Ardekani, M. R. S. Liver tonics: review of plants used in Iranian traditional medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5(3):170–181.
5. Khalili A., Fallah P., Hashemi S. A., Ahmadian-Attari M. M., Jamshidi V., Mazloom R., Beikzadeh L., Bayat G. New mechanistic insights into hepatoprotective activity of milk thistle and chicory quantified extract: The role of hepatic Farnesoid-X activated receptors. *Avicenna. Phytomedicine*. 2021;11(4):367–379. DOI: 10.22038/AJP.2020.17281.
6. Skala E., Makowczyńska J., Wiecefinska J., Kowalczyk T., Sitarek P. Caffeoylquinic Acids with Potential Biological Activity from Plant In vitro Cultures as Alternative Sources of Valuable Natural Products. *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(24):2817–2842. DOI: 10.2174/1381612826666200212115826.
7. Hong M., Li S., Tan H. Y., Wang N., Tsao S. W., Feng, Y. Current status of herbal medicines in chronic liver disease therapy: the biological effects, molecular targets and future prospects. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):28705–28745. DOI: 10.3390/ijms161226126.
8. Janda K., Gutowska I., Geszke-Moritz M., Jakubczyk K. The Common Cichory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties—A Review. *Molecules*. 2021;26(6):1814. DOI: 10.3390/molecules26061814.
9. Street R. A., Sidana J., Prinsloo G. *Cichorium intybus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1–13. DOI: 10.1155/2013/579319.
10. Moloudi M. R., Hassanzadeh K., Abdi M., Zandi F., Rahimi K., Izadpanah E. Hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extract of *Cichorium intybus* in a rat model of obstructive cholestasis. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2021;22(1):34–39. DOI: 10.1016/j.ajg.2020.08.006.
11. Elgengaihi S., Mossa A.-T. H., Refaie A. A., Aboubaker D. Hepatoprotective efficacy of *Cichorium intybus* L. extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2016;13(5):570–584. DOI: 10.3109/19390211.2016.1144230.
12. Hamdard J. Therapeutic potential of *Cichorium intybus* in lifestyle disorders: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016;3:20–25.
13. Asadi M., Mohammadian B., Shahriari A., Mohammadi M., Forouzandeh H. The Protective Effect of *Cichorium intybus* L. Hydroalcoholic Extract Against Methotrexate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2018;13(4):e59556. DOI: 10.5812/jjnpp.59556.
14. Jamshidzadeh A., Khoshnood M. J., Dehghani Z., Niknahad H. Hepatoprotective activity of *Cichorium intybus* L. leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2006;1:41–46. DOI: 10.22037/IJPR.2010.651.
15. Al-Malki A. L., Abo-Golayel M. K. Hepatoprotective efficacy of chicory alone or combined with dandelion leaves against induced liver damage. *Life Science Journal*. 2013;10(4):140–157.
16. Mohammadifar M., Taghizadeh M., Abed A., Soltani A., Tamtaji O., Khamechian T. Effect of *Ziziphus jujuba* Mill., *Cichorium intybus* L. and *Silybum marianum* (L.) Gaertn. combination extract on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Journal of Medicinal Plants*. 2019;18(72):133–142. DOI: 10.29252/jmp.4.72.S12.133.
17. Ghaffari A., Rafrat M., Navekar R., Sepehri B., Asghari-Jafarabadi M., Ghavami S. M. Turmeric and chicory seed have beneficial effects on obesity markers and lipid profile in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2019;89(5–6):293–302. DOI: 10.1024/0300-9831/a000568.

18. Gilani A. H., Janbaz K. H. Evaluation of the liver protective potential of Cichorium intybus seed extract on Acetaminophen and CCl₄-induced damage. *Phytomedicine*. 1994;1(3):193–197. DOI: 10.1016/S0944-7113(11)80064-4.
19. Zafar R., Mujahid Ali S. Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;63(3):227–231. DOI: 10.1016/S0378-8741(98)00087-7.
20. Крылова С. Г., Ефимова Л. А., Вымятина З. К., Зуева Е. П. Влияние экстракта корня цикория на морфофункциональное состояние печени у крыс с токсическим гепатитом. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2006;69(6):34–36.
21. Сайбель О. Л., Даргаева Т. Д., Радимич А. И., Дул В. Н., Николаев С. М., Хобракова В. Б., Мизина П. Г., Сидельников Н. И. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью и способ его получения. Патент РФ на изобретение № RU 2710270. 16.08.2019. Доступно по: https://patents.s3.yandex.net/RU2710270C1_20191225.pdf. Ссылка активна на 11.11.2021.
22. Carazzone C., Mascherpa D., Gazzani G., Papetti A. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2013;138(2–3):1062–1071. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.060
23. Clifford M. N., Zheng W., Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC–MSn. *Phytochemical Analysis*. 2006;17(6):384–393. DOI: 10.1002/pca.935.
24. Jaiswal R., Sovdat T., Vivan F., Kuhnert N. Profiling and Characterization by LC-MS of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (ilex paraguariensis). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(9):5471–5484. DOI: 10.1021/jf904537z.
25. Mascherpa D., Carazzone C., Marrubini G., Gazzani G., Papetti A. Identification of phenolic constituents in *Cichorium endivia* var. crispum and var. latifolium salads by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(49):12142–12150. DOI: 10.1021/jf3034754.
26. Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
27. Recknagel R. O., Glende E. A., Dolak J. A., Waller R. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 1989;43(1):139–154. DOI: 10.1016/0163-7258(89)90050-8.
28. Al-Malki A. L., Abo-Golayel M. K. Hepatoprotective efficacy of chicory alone or combined with dandelion leaves against induced liver damage. *Life Science Journal*. 2013;10(4):140–157.
29. Bortnikova V. V., Krepkova L. V., Babenko A. N., Saybel O. L., Borovkova M. V., Kuzina O. S., Mizina P. G., Job K. M., Sherwin C. M., Enioutina E. Y. A perspective botanical drug: Hepatoprotective activity of dry extract prepared from the aerial part of chicory plant (*Cichorium intybus* L.). *Clinical pharmacology in drug development*. 2021;10(51):100–101. DOI: 10.1002/cpdd.1004.
30. Gilani A. H., Janbaz K. H., Shah B. H. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL₄. *Pharmacological Research*. 1998;37(1):31–35. DOI: 10.1006/phrs.1997.0262.
31. Chang W. S., Chang Y. H., Lu F. J., Chiang H. C. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Research*. 1994;14(2A):501–506.
32. Tahara S., Baba N., Matsuo M., Kaneko T., Protective effect of epigallocatechin gallate and esculetin on oxidative dna damage induced by psoralen plus ultraviolet-a therapy, bioscience. *Biotechnology, and Biochemistry*. 2005;69(3):620–622. DOI: 10.1271/bbb.69.620.
33. Lin W. L., Wang C. J., Tsai Y. Y., Liu C. L., Hwang J. M., Tseng T. H. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. *Archives of Toxicology*. 2000;74(8):467–472. DOI: 10.1007/s002040000148.
34. Kim S. H., Kang K. A., Zhang R., Piao M. J., Ko D. O., Wang Z. H., Chae S. W., Kang S. S., Lee K. H., Kang H. K., Kang H. W., Hyun J. W. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 2008;29(11):1319–1326. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00878.x.
35. Lee M. J., Chou F. P., Tseng T. H., Hsieh M. H., Lin M. C., Wang C. J. Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(7):2130–2136. DOI: 10.1021/jf011296a.
36. Kour K., Bani S. Chicoric acid regulates behavioral and biochemical alterations induced by chronic stress in experimental Swiss albino mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011;99(3):342–348. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.05.008.
37. Tsai K. L., Kao C. L., Hung C. H., Cheng Y. H., Lin H. C., Chu P. M. Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by antioxidant action and anti-inflammation capacity. *Oncotarget*. 2017;8(18):29600–29612. DOI: 10.18632/oncotarget.16768.
38. Landmann M., Kanuri G., Spruss A., Stahl C., Bergheim I. Oral intake of chicoric acid reduces acute alcohol-induced hepatic steatosis in mice. *Nutrition*. 2014;30(7–8):882–889. DOI: 10.1016/j.nut.2013.11.015.
39. Машенцева А. А., Сейтеметбетов Т. С. Экспериментальное и теоретическое исследование взаимосвязи «структура-активность» производных коричной кислоты. *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2010;3(2):183–192.

REFERENCES

1. Vong S., Bell B. P. Chronic liver disease mortality in the United States, 1990–1998. *Hepatology*. 2004;39(2):476–483. DOI: 10.1002/hep.20049.
2. Gilani A. H., Janbaz K. H. Evaluation of the liver protective potential of Cichorium intybus seed extract on Acetaminophen and CCl₄-induced damage. *Phytomedicine*. 1994;1(3):193–197. DOI: 10.1016/S0944-7113(11)80064-4.
3. Reizis A. R., Borzakova S. N., Aksenova V. A. Drug-induced liver damage – an urgent problem of modern medicine. *Gastroenterologiya*. 2010;3:49–54. (In Russ.)
4. Akbarzadeh T., Sabourian R., Saeedi M., Rezaeizadeh H., Khanavi M., Ardekani, M. R. S. Liver tonics: review of plants used in Iranian traditional medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5(3):170–181.
5. Khalili A., Fallah P., Hashemi S. A., Ahmadian-Attari M. M., Jamshidi V., Mazloom R., Beikzadeh L., Bayat G. New mechanistic insights into hepatoprotective activity of milk thistle and chicory quantified extract: The role of hepatic Farnesoid-X activated receptors. *Avicenna. Phytomedicine*. 2021;11(4):367–379. DOI: 10.22038/AJP.2020.17281.
6. Skala E., Makowczyńska J., Wiczfinska J., Kowalczyk T., Sitarek P. Caffeoylquinic Acids with Potential Biological Activity from Plant In vitro Cultures as Alternative Sources of Valuable Natural Products. *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(24):2817–2842. DOI: 10.2174/1381612826666200212115826.
7. Hong M., Li S., Tan H. Y., Wang N., Tsao S. W., Feng, Y. Current status of herbal medicines in chronic liver disease therapy: the biological effects, molecular targets and future prospects. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):28705–28745. DOI: 10.3390/ijms161226126.
8. Janda K., Gutowska I., Geszke-Moritz M., Jakubczyk K. The Common Chicory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties—A Review. *Molecules*. 2021;26(6):1814. DOI: 10.3390/molecules26061814.
9. Street R. A., Sidana J., Prinsloo G. *Cichorium intybus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1–13. DOI: 10.1155/2013/579319.
10. Moloudi M. R., Hassanzadeh K., Abdi M., Zandi F., Rahimi K., Izadpanah E. Hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extract of *Cichorium intybus* in a rat model of obstructive cholestasis. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2021;22(1):34–39. DOI: 10.1016/j.ajg.2020.08.006.
11. Elgengaihi S., Mossa A.-T. H., Refaie A. A., Aboubaker D. Hepatoprotective efficacy of *Cichorium intybus* L. extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2016;13(5):570–584. DOI: 10.3109/19390211.2016.1144230.

12. Hamdard J. Therapeutic potential of *Cichorium intybus* in lifestyle disorders: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016;3:20–25.
13. Asadi M., Mohammadian B., Shahriari A., Mohammadi M., Forouzan-zandeh H. The Protective Effect of *Cichorium intybus* L. Hydroalcoholic Extract Against Methotrexate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2018;13(4):e59556. DOI: 10.5812/jjnpp.59556.
14. Jamshidzadeh A., Khoshnood M. J., Dehghani Z., Niknahad H. Hepatoprotective activity of *Cichorium intybus* L. leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2006;1:41–46. DOI: 10.22037/IJPR.2010.651.
15. Al-Malki A. L., Abo-Golayel M. K. Hepatoprotective efficacy of chicory alone or combined with dandelion leaves against induced liver damage. *Life Science Journal*. 2013;10(4):140–157.
16. Mohammadifar M., Taghizadeh M., Abed A., Soltani A., Tamtaji O., Khamechian T. Effect of *Ziziphus jujuba* Mill., *Cichorium intybus* L. and *Silybum marianum* (L.) Gaertn. combination extract on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Journal of Medicinal Plants*. 2019;18(72):133–142. DOI: 10.29252/jmp.4.72.S12.133.
17. Ghaffari A., Rafraf M., Navekar R., Sepehri B., Asghari-Jafarabadi M., Ghavami S. M. Turmeric and chicory seed have beneficial effects on obesity markers and lipid profile in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2019;89(5–6):293–302. DOI: 10.1024/0300-9831/a000568.
18. Gilani A. H., Janbaz K. H. Evaluation of the liver protective potential of *Cichorium intybus* seed extract on Acetaminophen and CCl₄-induced damage. *Phytomedicine*. 1994;1(3):193–197. DOI: 10.1016/S0944-7113(11)80064-4.
19. Zafar R., Mujahid Ali S. Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;63(3):227–231. DOI: 10.1016/S0378-8741(98)00087-7.
20. Krylova S. G., Efimova L. A., Vymyatnina Z. K., Zueva E. P. The effect of cichorium root extract on the morphofunctional state of liver in rats with carbon tetrachloride induced hepatitis model. *Éksperimentalnaya i klinicheskaya Farmakologiya*. 2006;69(6):34–36. (In Russ.)
21. Saybel O. L., Dargaeva T. D., Radimich A. I., Dul V. N., Nikolaev S. M., Khobrakova V. B., Mizina P. G., Sidelnikov N. I. *Sredstvo, obladayushchee immunomoduliruyushchey aktivnost'yu i sposob ego polucheniya* [An agent with immunomodulatory activity and a method for its production]. Patent RUS № 2710270. 16.08.2019. Available at: https://patents.s3.yandex.net/RU2710270C1_20191225.pdf. Accessed: 11.11.2021. (In Russ.)
22. Carazzone C., Mascherpa D., Gazzani G., Papetti A. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2013;138(2–3):1062–1071. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.060
23. Clifford M. N., Zheng W., Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC–MSn. *Phytochemical Analysis*. 2006;17(6):384–393. DOI: 10.1002/pca.935.
24. Jaiswal R., Sovdat T., Vivan F., Kuhnert N. Profiling and Characterization by LC-MS of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(9):5471–5484. DOI: 10.1021/jf904537z.
25. Mascherpa D., Carazzone C., Marrubini G., Gazzani G., Papetti A. Identification of phenolic constituents in *Cichorium endivia* var. crispum and var. latifolium salads by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(49):12142–12150. DOI: 10.1021/jf3034754.
26. Mironov A. N., editor. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs]. Moscow: Grif and K; 2012. 944 p. (In Russ.)
27. Recknagel R. O., Glende E. A., Dolak J. A., Waller R. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 1989;43(1):139–154. DOI: 10.1016/0163-7258(89)90050-8.
28. Al-Malki A. L., Abo-Golayel M. K. Hepatoprotective efficacy of chicory alone or combined with dandelion leaves against induced liver damage. *Life Science Journal*. 2013;10(4):140–157.
29. Bortnikova V. V., Krepkova L. V., Babenko A. N., Saybel O. L., Borovkova M. V., Kuzina O. S., Mizina P. G., Job K. M., Sherwin C. M., Enioutina E. Y. A perspective botanical drug: Hepatoprotective activity of dry extract prepared from the aerial part of chicory plant (*Cichorium intybus* L.). *Clinical pharmacology in drug development*. 2021;10(S1):100–101. DOI: 10.1002/cpdd.1004.
30. Gilani A. H., Janbaz K. H., Shah B. H. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL₄. *Pharmacological Research*. 1998;37(1):31–35. DOI: 10.1006/phrs.1997.0262.
31. Chang W. S., Chang Y. H., Lu F. J., Chiang H. C. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Research*. 1994;14(2A):501–506.
32. Tahara S., Baba N., Matsuo M., Kaneko T., Protective effect of epigallocatechin gallate and esculetin on oxidative dna damage induced by psoralen plus ultraviolet-a therapy, bioscience. *Biotechnology, and Biochemistry*. 2005;69(3):620–622. DOI: 10.1271/bbb.69.620.
33. Lin W. L., Wang C. J., Tsai Y. Y., Liu C. L., Hwang J. M., Tseng T. H. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. *Archives of Toxicology*. 2000;74(8):467–472. DOI: 10.1007/s002040000148.
34. Kim S. H., Kang K. A., Zhang R., Piao M. J., Ko D. O., Wang Z. H., Chae S. W., Kang S. S., Lee K. H., Kang H. K., Kang H. W., Hyun J. W. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 2008;29(11):1319–1326. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00878.x.
35. Lee M. J., Chou F. P., Tseng T. H., Hsieh M. H., Lin M. C., Wang C. J. Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(7):2130–2136. DOI: 10.1021/jf011296a.
36. Kour K., Bani S. Chicoric acid regulates behavioral and biochemical alterations induced by chronic stress in experimental Swiss albino mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011;99(3):342–348. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.05.008.
37. Tsai K. L., Kao C. L., Hung C. H., Cheng Y. H., Lin H. C., Chu P. M. Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by antioxidant action and anti-inflammation capacity. *Oncotarget*. 2017;8(18):29600–29612. DOI: 10.18632/oncotarget.16768.
38. Landmann M., Kanuri G., Spruss A., Stahl C., Bergheim I. Oral intake of chicoric acid reduces acute alcohol-induced hepatic steatosis in mice. *Nutrition*. 2014;30(7–8):882–889. DOI: 10.1016/j.nut.2013.11.015.
39. Mashentseva A. A., Seitembetov T. S. The Study of the "Structure-Activity" Relationship For a Cinnamic Acid Derivatives. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya = Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2010;3(2):183–192. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-46-53>
УДК 57.085.23



Оригинальная статья / Research article

Антиоксидантная активность серебросодержащих бионаноконпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток

Е. Е. Буйко^{1,2*}, М. В. Зыкова¹, В. В. Иванов¹, К. А. Братишко^{1,2}, А. А. Уфандеев¹,
И. О. Григорьева³, А. В. Цупко¹, Д. А. Михалёв¹, И. В. Перминова³, М. В. Белоусов^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, Россия, Томская обл., г. Томск, Московский тракт, д. 2

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ), 634034, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

*Контактное лицо: Буйко Евгений Евгеньевич. E-mail: buykoevgen@yandex.ru

ORCID: Е. Е. Буйко – <https://orcid.org/0000-0002-6714-1938>; М. В. Зыкова – <https://orcid.org/0000-0002-1973-8983>; В. В. Иванов – <https://orcid.org/0000-0001-9348-4945>;

К. А. Братишко – <https://orcid.org/0000-0001-6571-4061>; А. А. Уфандеев – <https://orcid.org/0000-0002-3837-1179>; И. О. Григорьева – <https://orcid.org/0000-0002-7978-9774>;

А. В. Цупко – <https://orcid.org/0000-0001-7169-8846>; Д. А. Михалёв – <https://orcid.org/0000-0002-5292-1368>; И. В. Перминова <https://orcid.org/0000-0001-9084-7851>;

М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 15.10.09.2021

Статья принята в печать: 19.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Наночастицы серебра являются перспективными агентами для подавления резистентных штаммов микроорганизмов и ускорения заживления гнойных ран. Окислительный стресс нарушает процессы нормального ранозаживления, что приводит к образованию хронических незаживающих ран. Поэтому определение способности новых ранозаживляющих агентов подавлять продукцию активных форм кислорода является актуальной задачей.

Цель. Исследовать влияние серебросодержащих бионаноконпозиций на основе гуминовых веществ на базальную и стимулированную *трет*-бутилгидропероксидом продукцию активных форм кислорода в культуре клеток нормальных фибробластов 3T3-L1 *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование проведено на 7 образцах исходных гуминовых веществ и соответствующих им биоматериалов с наночастицами серебра, синтезированных в Лаборатории природных гуминовых систем химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. Оценка внутриклеточной продукции активных форм кислорода проводилась с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндицетата. Клетки культивировали с образцами в течение 24 ч, для стимуляции продукции активных форм кислорода использовали *трет*-бутилгидропероксид. Детекцию осуществляли флуориметрически с помощью микропланшетного ридера.

Результаты и обсуждение. Наиболее выраженную антиоксидантную активность продемонстрировали три образца биоматериалов с наночастицами серебра, ультрадиспергированными в матрицах гуминовых веществ (CHS-AgNPs, CHP-AgNPs и CHE-AgNPs), что позволяет рассматривать их как наиболее перспективные в качестве фармацевтических агентов для лечения гнойно-воспалительных процессов. Наиболее вероятным механизмом высокой антиоксидантной активности исследуемых биоматериалов в отношении интрацеллюлярных активных форм кислорода является собственная активность гуминовых веществ по связыванию активных форм кислорода, в то время как наночастицы серебра в составе биоматериалов катализируют восстановительные процессы их взаимодействия с активными формами кислорода.

Заключение. Для исследуемых образцов биоматериалов с наночастицами серебра, ультрадиспергированными в матрицах гуминовых веществ, характерна выраженная антиоксидантная активность, что вместе с антибактериальными свойствами позволяет рассматривать их как потенциальные агенты для ускорения заживления гнойных ран.

Ключевые слова: гуминовые вещества, наночастицы серебра, антиоксидантная активность, *трет*-бутилгидропероксид, ранозаживление

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

Вклад авторов. М. В. Зыкова, М. В. Белоусов и В. В. Иванов обосновали актуальность работы. И. В. Перминова, И. О. Григорьева, А. В. Цупко, Д. А. Михалёв и М. В. Зыкова выделяли и синтезировали образцы и провели их стандартизацию. Е. Е. Буйко, В. В. Иванов, А. А. Уфандеев, К. А. Братишко разработали эксперимент, проводили оценку антиоксидантной активности изучаемых веществ, культуральные исследования. Е. Е. Буйко и В. В. Иванов участвовали в обработке данных и проводили теоретические расчеты. Е. Е. Буйко, М. В. Зыкова, В. В. Иванов, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 20-65-47052).

Для цитирования: Буйко Е. Е., Зыкова М. В., Иванов В. В., Братишко К. А., Уфандеев А. А., Григорьева И. О., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Перминова И. В., Белоусов М. В. Антиоксидантная активность серебросодержащих бионаноконпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):46–53. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-46-53>

© Буйко Е. Е., Зыкова М. В., Иванов В. В., Братишко К. А., Уфандеев А. А., Григорьева И. О., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Перминова И. В., Белоусов М. В., 2021

© Buyko E. E., Zyкова M. V., Ivanov V. V., Bratishko K. A., Ufandeev A. A., Grigorieva I. O., Tsupko A. V., Mikhalyov D. A., Perminova I. V., Belousov M. V., 2021

Antioxidant Activity of Silver-containing Bionanocompositions Based on Humic Substances in Cell Culture

Evgeny E. Buyko^{1,2*}, Maria V. Zykova¹, Vladimir V. Ivanov¹, Kristina A. Bratishko^{1,2}, Alexander A. Ufandeev¹, Irina O. Grigorieva³, Andrey V. Tsupko¹, Dmitry A. Mikhalyov¹, Irina V. Perminova³, Mikhail V. Belousov^{1,2}

¹ Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moskovsky tract, Tomsk, Tomsk region, 634050, Russia

² The National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenina ave., Tomsk, 634034, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Evgeny E. Buyko. E-mail: buykoevgen@yandex.ru

ORCID: Evgeny E. Buyko – <https://orcid.org/0000-0002-6714-1938>; Maria V. Zykova – <https://orcid.org/0000-0002-1973-8983>; Vladimir V. Ivanov – <https://orcid.org/0000-0001-9348-4945>;

Kristina A. Bratishko – <https://orcid.org/0000-0001-6571-4061>; Alexander A. Ufandeev – <https://orcid.org/0000-0002-3837-1179>;

Irina O. Grigorieva – <https://orcid.org/0000-0002-7978-9774>; Andrey V. Tsupko – <https://orcid.org/0000-0001-7169-8846>; Dmitry A. Mikhalyov – <https://orcid.org/0000-00002-5292-1368>;

Irina V. Perminova – <https://orcid.org/0000-0001-9084-7851>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 15.10.2021

Revised: 19.11.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Silver nanoparticles are promising agents for suppressing resistant strains of microorganisms and accelerating the purulent wounds healing. Oxidative stress disrupts normal wound healing processes, which leads to the formation of chronic non-healing wounds. Therefore, the determination of the ability of new wound healing agents to decrease the production of reactive oxygen species is a relevant task.

Aim. The aim of the current study was to investigate the effect of silver-containing bionanocompositions based on humic substances on the basal and *tert*-butyl hydroperoxide-stimulated production of reactive oxygen species at the normal fibroblasts 3T3-L1 cell culture *in vitro*.

Materials and methods. The study was carried out on 7 samples of initial humic substances and biomaterials with silver nanoparticles synthesized in the Laboratory of Natural Humic Systems, Faculty of Chemistry, Moscow State University named after M. V. Lomonosov. The intracellular production of reactive oxygen species was assessed using a 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate fluorescent probe. Cells were cultured with samples for 24 h; *tert*-butyl hydroperoxide was used to stimulate the production of reactive oxygen species. Detection was performed fluorometrically using a microplate reader.

Results and discussion. The most pronounced antioxidant activity was demonstrated by three samples of biomaterials with silver nanoparticles ultradispersed in humic substances matrices (CHS-AgNPs, CHP-AgNPs and CHE-AgNPs), which allows us to consider them as the most promising pharmaceutical agents for the treatment of purulent-inflammatory processes. The most probable mechanism of the high antioxidant activity of the studied biomaterials in relation to intracellular reactive oxygen species is the intrinsic activity of humic substances to bind reactive oxygen species, while silver nanoparticles in biomaterials catalyze the reduction processes of their interaction with reactive oxygen species.

Conclusion. For the studied samples of biomaterials with silver nanoparticles ultradispersed in matrices of humic substances pronounced antioxidant activity was shown. Together with antibacterial properties, it makes it possible to consider them as potential agents for purulent wounds healing accelerating.

Keywords: humic substances, silver nanoparticles, antioxidant activity, *tert*-butyl hydroperoxide, wound healing

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

Contribution of the authors. Maria V. Zykova, Mikhail V. Belousov and Vladimir V. Ivanov substantiated the relevance of the work. Irina V. Perminova, Irina O. Grigorieva, Andrey V. Tsupko, Dmitry A. Mikhalev and Maria V. Zykova isolated, synthesized and standardized studied samples. Evgeny E. Buyko, Vladimir V. Ivanov, Alexander A. Ufandeev, Kristina A. Bratishko designed an experiment, assessed the antioxidant activity of the studied substances, provided cultural studies. Evgeny E. Buyko and Vladimir V. Ivanov participated in data processing and performed theoretical calculations. Evgeny E. Buyko, Maria V. Zykova, Vladimir V. Ivanov, Mikhail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. This research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (Grant No. 20-65-47052).

For citation: Buyko E. E., Zykova M. V., Ivanov V. V., Bratishko K. A., Ufandeev A. A., Grigorieva I. O., Tsupko A. V., Mikhalyov D. A., Perminova I. V., Belousov M. V. Antioxidant activity of silver-containing bionanocompositions based on humic substances in cell culture. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):46–53. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-46-53>

ВВЕДЕНИЕ

Достижения в области нанотехнологий привели к повышенному вниманию к наноразмерным частицам со стороны специалистов всех областей науки [1]. Уникальные химические, физические и биологические свойства наночастиц предоставляют доступ к широкому спектру их применения в электронике, спектральном анализе, катализе, а также биомедицине и фармацевтической промышленности для поиска новых эффективных лекарственных средств [2]. Осо-

бое внимание исследователей привлекают наночастицы металлов, в частности серебра (AgNPs), ввиду наличия у них противомикробных и ранозаживляющих свойств [3, 4]. Как следствие, AgNPs находят применение в качестве потенциальных антибактериальных агентов для подавления резистентных штаммов микроорганизмов и ускорения заживления гнойных ран [5]. Физико-химические свойства AgNPs в основном определяются их формой, размером, диэлектрическими свойствами и дисперсностью [6].

Известно, что активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в процессе смены стадий заживления ран [7]. Сразу после формирования раны начинается комплексный, но упорядоченный процесс заживления, состоящий из перекрывающихся фаз: коагуляции, иммунного ответа, воспаления, пролиферации и ремоделирования [8, 9]. При низком уровне АФК в ране происходит подавление инфекционных агентов и стимулируется эффективное заживление путем индукции антиапоптотических сигналов [10, 11]. В то же время избыточный и неконтролируемый окислительный стресс способствует нарушению регуляции воспалительных процессов вследствие окислительной модификации биомолекул клеток и индукции апоптоза, что приводит к образованию хронических незаживающих ран [12]. Экспериментальные и клинические исследования показали, что стратегия использования агентов, обладающих антиоксидантной активностью (АОА), демонстрирует положительные результаты при лечении незаживающих ран [10]. Антиоксиданты – это химические соединения, которые могут отдавать свои электроны молекулам АФК, тем самым препятствуя акцепции электронов от других биологически важных молекул (например, белков или ДНК) [13]. Эти вещества обеспечивают протекание сложных каскадов реакций по превращению АФК в более стабильные молекулы, такие как H_2O и O_2 . Таким образом, интерес к использованию соединений с АОА для лечения ран растет, и определение способности новых ранозаживляющих агентов подавлять продукцию АФК и снижать их уровень является актуальной задачей.

Процессы синтеза AgNPs с использованием химических или физических методов (с помощью микроволнового или γ -излучения, термического разложения и химического восстановления) часто требуют использования токсичных восстанавливающих и стабилизирующих агентов (гидразин-гидрат, натрий боргидрид, этиленгликоль) [14] и сопряжены с другими экологическими и биологическими рисками [6]. Поэтому для производства наноматериалов биомедицинского назначения в настоящее время применяется «зеленый синтез» или «биогенный синтез», который признается специалистами как экоадаптивный подход к созданию разнообразных наноматериалов, включая наночастицы металлов [6, 15–17]. Биосинтез наночастиц может быть достигнут путем восстановления катионов металлов с использованием экстрактов растений, дрожжей, водорослей, лишайников, грибов и бактерий в качестве исходных матриц. Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой гетерогенные природные биополимеры, содержащиеся в различных каустобиолитах (торфе, буром угле, донных отложениях и пр.) [18, 19], и являются перспективными матрицами для синтеза AgNPs. Ранее было показано, что ГВ оказывают иммуномодулирующее и антиоксидантное действие в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [20–22]. В связи с этим в качестве объектов исследования в настоящей работе были выбраны бионано-

композиции, содержащие биологически активное серебро, ультрадиспергированное в матрицах ГВ.

Цель. Исследовать влияние серебросодержащих бионаноконпозиций на основе гуминовых веществ на базальную и стимулированную *трет*-бутилгидропероксидом продукцию активных форм кислорода в культуре клеток нормальных фибробластов 3T3-L1 *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являются 7 исходных образцов ГВ, представляющие собой как ГВ, выделенные из природного сырья (торфа) на кафедре химии СибГМУ и на химическом факультете МГУ, так и коммерческие гуминовые препараты, выделенные из угля, а также соответствующие им 7 образцов биоматериалов, содержащие наночастицы серебра (ГВ-AgNPs), синтезированные в Лаборатории природных гуминовых систем химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. Синтез биоматериалов ГВ-AgNPs проводили путем восстановления ионов серебра в растворах ГВ (в концентрации 15 г/л) с использованием раствора $AgNO_3$ до создания конечной концентрации наночастиц серебра 20 ммоль/л. Характеристика объектов исследования представлена в таблице 1.

Оценка внутриклеточной продукции АФК проводилась с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата (ДХФДА) по описанной ранее методике [23]. Принцип метода основан на способности ДХФДА легко проникать в цитоплазму клеток и деэстерифицироваться под действием внутриклеточных эстераз. 2,7-Дихлородигидрофлуоресцеин не способен транспортироваться из клеток и является слабо флуоресцирующим агентом, но в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорофлуоресцеин. При повышении внутриклеточного уровня оксидантов увеличивается скорость окисления 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина. Таким образом, активация внутриклеточного окисления сопровождается увеличением флуоресценции.

Клетки линии 3T3-L1 культивировали в стандартных условиях [атмосфера 5 % CO_2 , среда DMEM/F-12 (GibcoTM, США) + 10 % FBS (GibcoTM, США) + 2 mM L-глутамин (GibcoTM, США) и 1 % гентамицин (GibcoTM, США)] и рассаживали на черные 96-луночные культуральные планшеты для измерения флуоресценции (1×10^4 клеток/лунку). В соответствующие лунки вносили образцы исследуемых ГВ и ГВ-AgNPs (12,5 мкг/мл) и инкубировали 24 ч. Затем клетки отмывали от образцов, в лунки вносили рабочий раствор ДХФДА (10 мкМ) (Sigma-Aldrich, США, D6883). Планшеты инкубировали в термостате 20 минут при 37 °C, отмывали от ДХФДА и для стимуляции продукции АФК вносили *трет*-бутилгидропероксид (t-BHP) (25 мкМ) (Sigma-Aldrich, США, B2633). После инкубации в течение 60 минут при 37 °C определяли флуоресценцию в лунках при $\lambda_{ex} = 485$ нм и $\lambda_{em} = 530$ нм.

Таблица 1. Экспериментальные образцы гуминовых веществ (ГВ) и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе (ГВ-AgNPs)**Table 1.** Experimental samples of humic substances (HS) and silver-containing bionanomaterials (HS-AgNPs)

Шифр ГВ HS code	Шифр ГВ-AgNPs HS-AgNPs code	Источник исходных субстанций ГВ Source of the initial HS
CHS-K	CHS-AgNPs	Гуминовые вещества угля, коммерческий препарат (ООО «Сахалинские гуматы», Россия) Coal humic substances, commercial preparation ("Sakhalin humates" LLC, Russia)
CHE-K	CHE-AgNPs	Гуминовые вещества угля, коммерческий препарат (ЗАО «Генезис», Россия) Coal humic substances, commercial preparation ("Genesis" CJSC, Russia)
CHP-K	CHP-AgNPs	Гуминовые кислоты угля «Powhumus», коммерческий препарат (Humintech GmbH, Германия) Humic acids of «Powhumus» coal, commercial preparation (Humintech GmbH, Germany)
FA	FA-AgNPs	Фульвокислоты торфа «Fulvagra», коммерческий препарат (Humintech GmbH, Германия) Fulvic acids of peat «Fulvagra», commercial preparation (Humintech GmbH, Germany)
Peat1	Peat1-AgNPs	Гуминовые кислоты верхового ангустифолиум-торфа Томской области, выделенные экстракцией 0,1 моль/л раствором NaOH по методике, описанной в [18] Humic acids of high-moor peat angustifolium of the Tomsk region, isolated by extraction with 0.1 M NaOH solution according to the method described in [18]
PHF-T3	PHF-T3-AgNPs	Гуминовые вещества низинного торфа Тверской области, выделенные экстракцией 1 моль/л раствором NaOH, обессоленные на катионите Ку-2-8, высушенные методом лиофилизации Humic substances of low-lying peat of the Tver region, isolated by extraction with 1 M NaOH solution, desalted on a Ku-2-8 cation exchanger, dried by lyophilization
Peat2	Peat2-AgNPs	Гуминовые кислоты верхового сфагново-мочажинного торфа Томской области, выделенные экстракцией 0,1 моль/л раствором NaOH по методике, описанной в [18] Humic acids of high sphagnum-hollow peat of the Tomsk region, isolated by extraction with 0.1 mol/L NaOH solution according to the method described in [18]

Содержание АФК выражали в единицах флуоресценции. Для оценки антиоксидантной активности ГВ и ГВ-AgNPs величины флуоресценции в лунках, в которые вносили только ДХФДА или ДХФДА и t-BHP, принимали за 100 % базальной или стимулированной про-

дукции АФК соответственно. Антиоксидантную активность образцов выражали как процент снижения флуоресценции в соответствующих лунках относительно базального или стимулированного уровней.

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Все результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm SE$, $n = 6$). Проверку на нормальность распределения значений проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка. Анализ уровня статистической значимости различий между выборками выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

In vitro оценка АОА с использованием ДХФДА редко применяется для анализа наночастиц. Большинство исследований основаны на использовании в модельных системах ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразилгидрат) или ABTS (2,2'-азино-бис[3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота]) [24, 25]. Однако эти методы не отражают АОА на клеточном уровне, поскольку не учитывают физиологические условия, такие как pH, температура и биодоступность.

Прооксидант t-BHP используется в моделировании окислительного стресса *in vitro* [26, 27]. Введение t-BHP приводит к увеличению содержания окисленной формы глутатиона (GSSG) в клетке, что является причиной изменения экспрессии про/антиапоптотических белков Bax/Bcl-2 вследствие активации каспазы-3 и апоптотической гибели клетки [28].

Перед проведением экспериментов мы исследовали влияние различных концентраций прооксиданта на уровень внутриклеточных АФК в культуре клеток 3T3-L1 в условиях аналогичного эксперимента. Результаты представлены на рисунке 1.

В диапазоне концентраций от 6,25 до 50 мкМ прооксиданта наблюдается линейная зависимость интенсивности флуоресценции (уравнение линейной регрессии $y = 546,8x + 7043$; $R^2 = 0,9945$; $P = 0,0027$). При концентрациях t-BHP выше 50 мкМ линейность зависимости нарушается. В связи с этим в дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию 25 мкМ, которая находится в середине линейного диапазона. Добавление прооксиданта t-BHP в культуру клеток 3T3-L1 вызывало повышение интенсивности флуоресценции ДХФДА в 4,0 раза ($p < 0,05$) ($21326,0 \pm 1001,9$ ед. флуоресценции) по сравнению с контролем ($5300,1 \pm 68,9$ ед. флуоресценции).

В результате проведенных экспериментов установлено, что образцы исходных ГВ, а также биоматериалы с наночастицами серебра ГВ-AgNPs не проявляют прооксидантных эффектов *in vitro*. В то же время выраженность АОА в отношении базального (без добавления прооксиданта) и стимулированного t-BHP уровней внутриклеточной продукции АФК существенно различается между исследуемыми образцами (рисунок 2).

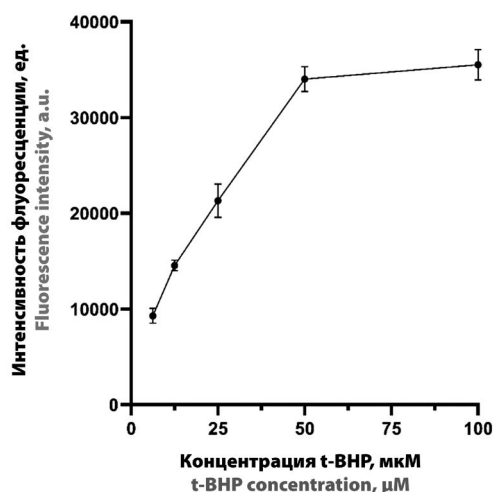


Рисунок 1. Влияние различных концентраций прооксиданта *трет*-бутилгидропероксида (t-BHP) на флуоресценцию 2,7-дихлороди гидрофлуоресцеиндиацетата в культуре клеток 3T3-L1

Figure 1. Effect of different concentrations of the prooxidant *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) on the fluorescence of 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate in 3T3-L1 cells

В ряду исходных образцов ГВ в эксперименте с оценкой влияния на базальный уровень продукции АФК наиболее активным является образец CHE-K (снижение уровня внутриклеточных АФК на $20,7 \pm 3,1$ %), затем по убыванию располагаются еще три образца с достаточно близкой активностью – CHP-K ($18,8 \pm 4,6$ %), FA ($18,3 \pm 3,3$ %) и CHS-K ($15,2 \pm 1,5$ %). Остальные образцы отличались относительно низкой (в среднем $7,6 - 5,3$ %) собственной АОА. Аналогичная картина распределения активности сохранилась и при добавлении к клеткам t-BHP в качестве прооксиданта: наиболее активными остались образцы CHS-K

($30,1 \pm 2,9$ %), CHP-K ($24,3 \pm 2,3$ %) и CHE-K ($17,3 \pm 1,6$ %), далее по убыванию располагаются два образца с близкой и невысокой активностью: Peat1 ($10,0 \pm 2,7$ %) и FA ($9,9 \pm 2,0$ %), для оставшихся двух образцов отмечена наименьшая АОА.

Для образцов с наночастицами серебра ГВ-AgNPs в целом отмечена более высокая АОА в сравнении с исходными ГВ. Так, в эксперименте по оценке снижения базальной продукции АФК без прооксидантной стимуляции наиболее активными были четыре образца – CHP-AgNPs ($42,1 \pm 4,3$ %), CHE-AgNPs ($41,9 \pm 2,2$ %), CHS-AgNPs ($38,1 \pm 1,8$ %) и FA-AgNPs ($30,2 \pm 3,1$ %).

Таким образом, сохранилась ранее описанная закономерность по АОА образцов CHE-K, CHP-K, CHS-K и FA. Для остальных образцов отмечена значительно более низкая (в среднем $16,4 - 10,2$ %) базальная АОА. Аналогичная картина распределения активности после добавления в инкубационную среду прооксиданта также отмечена и для образцов ГВ-AgNPs: наиболее активными остались образцы CHS-AgNPs ($47,9 \pm 1,5$ %) и CHP-AgNPs ($38,0 \pm 2,6$ %), несколько меньшая активность отмечена для CHE-AgNPs ($22,3 \pm 1,4$ %) и FA-AgNPs ($18,4 \pm 3,1$ %), также была отмечена достаточно высокая АОА Peat1 ($23,1 \pm 3,6$ %). Для оставшихся двух образцов отмечена наименьшая АОА.

С позиций влияния на процессы окислительного стресса в ране наиболее перспективными образцами в качестве фармацевтических агентов для лечения гнойно-воспалительных процессов являются три образца ГВ-AgNPs – CHS-AgNPs, CHP-AgNPs и CHE-AgNPs.

Результаты исследования АОА AgNPs различного происхождения часто противоречивы [29]. Известно, что способность AgNPs связывать свободные радикалы и прерывать цепные процессы окисления обусловлена в первую очередь антиоксидантной и, в частности, антирадикальной активностью исходных матриц, используемых для синтеза [29].

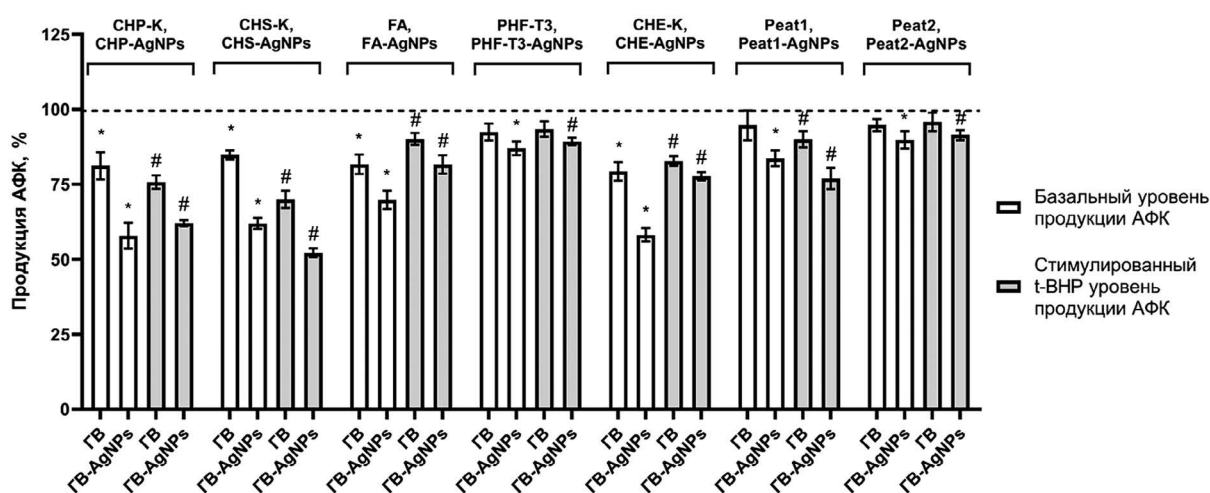


Рисунок 2. Влияние матриц гуминовых веществ (ГВ) и серебросодержащих биоматериалов на их основе (ГВ-AgNPs) на базальную (без добавления прооксиданта) и стимулированную *трет*-бутилгидропероксидом (t-BHP) внутриклеточную продукцию активных форм кислорода (АФК) в культуре клеток линии 3T3-L1.

Примечания. * Отличия от базального уровня АФК в культуре клеток 3T3-L1 статистически значимы, $p < 0,05$; # – отличия от стимулированного t-BHP уровня АФК в культуре клеток 3T3-L1 статистически значимы, $p < 0,05$

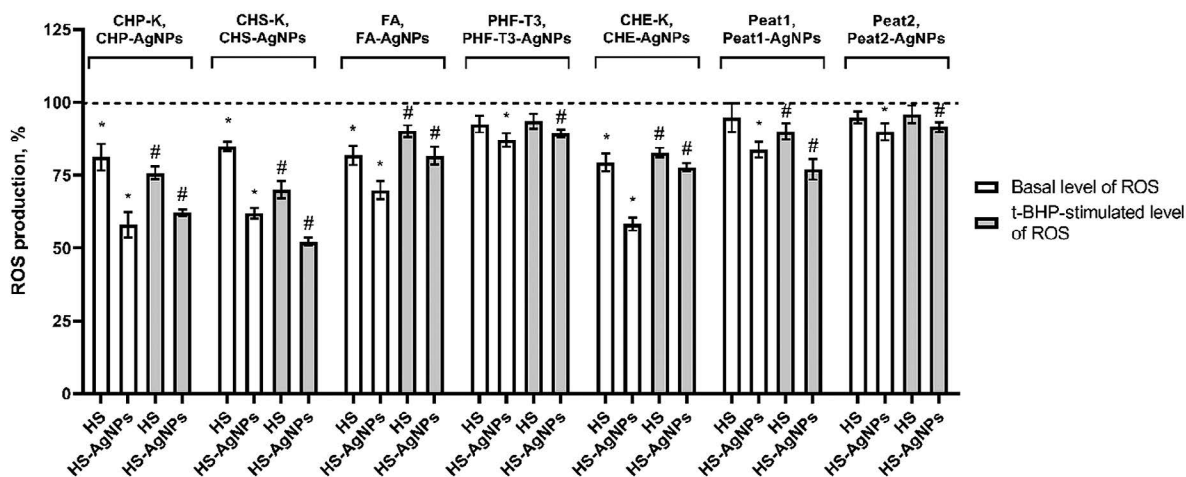
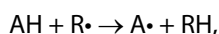


Figure 2. Influence of matrices of humic substances (HS) and silver-containing biomaterials (HS-AgNPs) on the basal (without the addition of a prooxidant) and stimulated by *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) intracellular production of reactive oxygen species (ROS) in the cell line 3T3-L1.

Notes. * Differences from the basal ROS level in the 3T3-L1 cell culture are statistically significant, $p < 0.05$; # – differences from the t-BHP-stimulated ROS level in the 3T3-L1 cell culture are statistically significant, $p < 0.05$

ГВ обладают собственной выраженной АОА вследствие наличия в их молекулярном строении определенных структурных детерминант [18], они содержат большое количество фрагментов, способных к окислению. Один из механизмов АОА ГВ реализуется за счет наличия большого количества фенольных гидроксильных групп в их структуре, что позволяет перехватывать свободные радикалы в реакции:



где AH – антиоксидант с подвижным атомом водорода; $R\cdot$ – радикальный инициатор или промежуточный радикальный продукт свободно-радикального окисления.

ГВ также обладают высокой каталитической активностью в реакциях электровосстановления кислорода за счет наличия в их структуре хиноидных группировок [18, 30–31], что в совокупности с наличием стабилизированных жесткой полимерной матрицей органических радикалов семихинонного типа [18, 32] говорит об их высокой активности как восстановителей и ловушек свободных радикалов.

В наших экспериментах показана более выраженная АОА ГВ-AgNPs в сравнении с исходными матрицами ГВ. Известно, что серебро является катализатором восстановительных реакций, лежащих в основе реализации антиоксидантных эффектов, а придание серебру наноразмерной формы повышает его реакционную способность за счет дисперсионных свойств частиц и высокого отношения площади их поверхности к объему частицы [33–36]. Ранее было продемонстрировано, что AgNPs могут использоваться в качестве каталитических агентов в реакциях восстановления метиленовой сини [34], азокрасителей Direct Orange 26 (DO26) и Direct Blue 15 (DB15) [35], а также 4-нитрофенола [33, 36]. Таким образом, более высокая АОА ГВ-AgNPs в отношении интрацеллюлярных

АФК объясняется собственной высокой радикал-связывающей активностью ГВ, в то время как AgNPs катализируют восстановительные процессы их взаимодействия с АФК. Механизмы каталитической активности AgNPs в случае антирадикальных реакций требуют дальнейшего углубленного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проведена оценка влияния 7 образцов серебросодержащих бионаноматериалов ГВ-AgNPs, синтезированных в Лаборатории природных гуминовых систем химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, а также исходных матриц ГВ на базальную и стимулированную t-BHP продукцию АФК в культуре клеток нормальных фибробластов 3T3-L1 *in vitro*. Три образца ГВ-AgNPs (CHS-AgNPs, CHP-AgNPs и CHE-AgNPs) являются наиболее перспективными в качестве фармацевтических агентов для лечения гнойно-воспалительных процессов в контексте влияния на окислительно-восстановительный баланс в ране. В качестве предполагаемого механизма АОА исследуемых ГВ-AgNPs предлагается первичная роль исходных ГВ как доноров протона, восстановителей и ловушек свободных радикалов, в то время как AgNPs выполняют функции катализатора процесса взаимодействия ГВ с АФК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anjum S., Hashim M., Malik S. A., Khan M., Lorenzo J. M., Abbasi B. H., Hano, C. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*. 2021;13(18):4570. DOI: 10.3390/cancers13184570.
2. Abbasi E., Milani M., Fekri Aval S., Kouhi M., Akbarzadeh A., Tayefi Nasrabadi H., Nikasa P., Joo S.W., Hanifehpour Y., Nejati-Koshki K., Samiei M. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical reviews in microbiology*. 2016;42(2):173–180. DOI: 10.3109/1040841X.2014.912200.

3. Paladini F., Pollini M. Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends. *Materials*. 2019;12(16):2540. DOI: 10.3390/ma12162540.
4. GhavamiNejad A., Park C.H., Kim C.S. In situ synthesis of antimicrobial silver nanoparticles within antifouling zwitterionic hydrogels by catecholic redox chemistry for wound healing application. *Biomacromolecules*. 2016;17(3):1213–1223. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00039.
5. Tian X., Jiang X., Welch C., Croley T.R., Wong T.Y., Chen C., Fan S., Chong Y., Li R., Ge C., Chen C., Yin J.J. Bactericidal effects of silver nanoparticles on lactobacilli and the underlying mechanism. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(10):8443–8450. DOI: 10.1021/acsami.7b17274.
6. Netala V.R., Bethu M.S., Pushpalatha B., Baki V.B., Aishwarya S., Rao J.V., Tartte V. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:5683. DOI: 10.2147/IJN.S112857.
7. Comino-Sanz I.M., López-Franco M.D., Castro B., Pancorbo-Hidalgo P.L. The Role of Antioxidants on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(16):3558. DOI: 10.3390/jcm10163558.
8. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Molecular Research*. 2009;37(5):1528–1542. DOI: 10.1177/147323000903700531.
9. Rosenbaum A.J., Banerjee S., Rezak K.M., Uhl R.L. Advances in wound management. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2018;26(23):833–843. DOI: 10.5435/JAAOS-D-17-00024.
10. Cano Sanchez M., Lancel S., Boulanger E., Nevriere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(8):98. DOI: 10.3390/antiox7080098.
11. Rodriguez P.G., Felix F.N., Woodley D.T., Shim E.K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery*. 2008;34(9):1159–1169. DOI: 10.1177/147323000903700531.
12. Bryan N., Ahswin H., Smart N., Bayon Y., Wohler S., Hunt J.A. Reactive oxygen species (ROS)—a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater*. 2012;24:249–265. DOI: 10.22203/ecm.v024a18.
13. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*. 2017;14(1):89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557.
14. Musino D., Devic J., Lelong C., Luche S., Rivard C., Dalzon B., Landrot G., Rabilloud T., Capron I. Impact of Physico-Chemical Properties of Cellulose Nanocrystal/Silver Nanoparticle Hybrid Suspensions on Their Biocidal and Toxicological Effects. *Nanomaterials*. 2021;11(7):1862. DOI: 10.3390/nano11071862.
15. Alahmad A., Feldhoff A., Bigall N.C., Rusch P., Scheper T., Walter J.G. Hypericum perforatum L.-mediated green synthesis of silver nanoparticles exhibiting antioxidant and anticancer activities. *Nanomaterials*. 2021;11(2):487. DOI: 10.3390/nano11020487.
16. Nguyen T.H.A., Nguyen V.C., Phan T.N.H., Le V.T., Vasseghian Y., Trubitsyn M.A., Nguyen A.T., Chau T.P., Doan V.D. Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe (III) ions. *Chemosphere*. 2021;287(3):132271. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132271.
17. Aboyewa J.A., Sibuyi N.R., Meyer M., Oguntibeju O.O. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Some Selected Medicinal Plants from Southern Africa and Their Biological Applications. *Plants*. 2021;10(9):1929. DOI: 10.3390/plants10091929.
18. Zykova M.V., Schepetkin I.A., Belousov M.V., Krivoshchekov S.V., Logvinova L.A., Bratishko K.A., Yusubov M.S., Romanenko S.V., Quinn M.T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules*. 2018;23(4):753. DOI: 10.3390/molecules23040753.
19. Orlov D.S. Humus acids of soils. Rotterdam: AA Balkema; 1985. 378 p.
20. Schepetkin I., Khlebnikov A., Kwon B.S. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug development research*. 2002;57(3):140–159. DOI: 10.1002/ddr.10058.
21. Trofimova E.S., Zykova M.V., Ligacheva A.A., Sherstoboev E.Y., Zhdanov V.V., Belousov M.V., Krivoshchekov S.V., Danilets M.G., Dygai A.M. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in vitro. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;162(6):741–745. DOI: 10.1007/s10517-017-3702-5.
22. Jooné G.K., Dekker J., van Rensburg C.E.J. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 2003;58(3–4):263–267. DOI: 10.1515/znc-2003-3-421.
23. Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В., Большаков М.А., Кутенков О.П., Ростов В.В. Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*. 2010;333:161–163.
24. Laghrib F., Houcini H., Khalil F., Liba A., Bakasse M., Lahrich S., El Mhammedi M.A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Chitosan as Stabilizer Agent: Application towards Electrocatalytic Reduction of p-Nitrophenol. *ChemistrySelect*. 2020;5(3):1220–1227. DOI: 10.1002/slct.201903955.
25. Nasirizadeh N., Shekari Z., Dehghani M., Makarem S. Delphinidin immobilized on silver nanoparticles for the simultaneous determination of ascorbic acid, noradrenalin, uric acid, and tryptophan. *Journal of food and drug analysis*. 2016;24(2):406–416. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.11.011.
26. Ha D.T., Oh J., Khoi N.M., Dao T.T., Dung L.V., Do T.N.Q., Lee S.M., Jang T.S., Jeong G., Na M. In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanotriol against t-BHP-induced oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;150(3):875–885. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.039.
27. Ye H., Luo J., Hu D., Yang S., Zhang A., Qiu Y., Ma X., Wang J., Hou J., Bai J. Total Flavonoids of Crocus sativus Petals Release tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in BRL-3A Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:1–15. DOI: 10.1155/2021/5453047.
28. Заводник И.Б. Образование активных форм кислорода и морфологические изменения клеток линии B14 при окислительном воздействии, индуцируемом органическим гидропероксидом. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2015;3:104–108.
29. Bedlovičová Z., Strapáč I., Baláz M., Salayová A. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecule*. 2020;25(14):3191. DOI: 10.3390/molecules25143191.
30. Aeschbacher M., Graf C., Schwarzenbach R.P., Sander M. Antioxidant properties of humic substances. *Environ Sci Technol*. 2012;46(9):4916–4925. DOI: 10.1021/es300039h.
31. Братишко К.А., Зыкова М.В., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Дрыгунова Л.А., Перминова И.В., Белоусов М.В. Гуминовые кислоты торфа – перспективные биологически активные вещества с антиоксидантной активностью для разработки протекторных средств. *Химия растительного сырья*. 2021;1:287–298. DOI: 10.14258/jcprm.2021018784.
32. Klavins M., Sire J. Variations of humic acids properties within peat profiles. *Mires and peat*. 2010;4:175–197.
33. Vijilvani C., Bindhu M.R., Frincy F.C., AlSalhi M.S., Sabitha S., Saravanakumar K., Devanesan S., Umavedi M., Aljaafreh M.J., Atif M. Antimicrobial and catalytic activities of biosynthesized gold, silver and palladium nanoparticles from Solanum nigrum leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;202:111713. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111713.
34. Du L., Xu Q., Huang M., Xian L., Feng J.X. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Materials Chemistry and Physics*. 2015;160:40–47. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2015.04.003.
35. Hu D., Yang X., Chen W., Feng Z., Hu C., Yan F., Chen X., Qu D., Chen Z. Rhodiola rosea Rhizome Extract-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Potential Antioxidant and Catalytic Reduction Activities. *ACS omega*. 2021;6(38):24450–24461. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.
36. Bharadwaj K.K., Rabha B., Pati S., Choudhury B.K., Sarkar T., Gogoi S.K., Kakati N., Baishya D., Kari Z.A., Edinur H.A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Diospyros malabarica Fruit Extract and Assessments of Their Antimicrobial, Anticancer and Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol (4-NP). *Nanomaterials*. 2021;11(8):1999. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.

REFERENCES

1. Anjum S., Hashim M., Malik S.A., Khan M., Lorenzo J.M., Abbasi B.H., Hano, C. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*. 2021;13(18):4570. DOI: 10.3390/cancers13184570.

2. Abbasi E., Milani M., Fekri Aval S., Kouhi M., Akbarzadeh A., Tayefi Nasrabadi H., Nikasa P., Joo S.W., Hanifehpour Y., Nejaati-Koshki K., Samiei M. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical reviews in microbiology*. 2016;42(2):173–180. DOI: 10.3109/1040841X.2014.912200.
3. Paladini F., Pollini M. Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends. *Materials*. 2019;12(16):2540. DOI: 10.3390/ma12162540.
4. GhavamiNejad A., Park C.H., Kim C.S. In situ synthesis of antimicrobial silver nanoparticles within antifouling zwitterionic hydrogels by catecholic redox chemistry for wound healing application. *Biomacromolecules*. 2016;17(3):1213–1223. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00039.
5. Tian X., Jiang X., Welch C., Croley T.R., Wong T.Y., Chen C., Fan S., Chong Y., Li R., Ge C., Chen C., Yin J.J. Bactericidal effects of silver nanoparticles on lactobacilli and the underlying mechanism. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(10):8443–8450. DOI: 10.1021/acsami.7b17274.
6. Netala V.R., Bethu M.S., Pushpalatha B., Baki V.B., Aishwarya S., Rao J.V., Tartte V. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:5683. DOI: 10.2147/IJN.S112857.
7. Comino-Sanz I.M., López-Franco M.D., Castro B., Pancorbo-Hidalgo P.L. The Role of Antioxidants on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(16):3558. DOI: 10.3390/jcm10163558.
8. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2009;37(5):1528–1542. DOI: 10.1177/147323000903700531.
9. Rosenbaum A.J., Banerjee S., Rezak K.M., Uhl R.L. Advances in wound management. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2018;26(23):833–843. DOI: 10.5435/JAAOS-D-17-00024.
10. Cano Sanchez M., Lancel S., Boulanger E., Neviere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(8):98. DOI: 10.3390/antiox7080098.
11. Rodriguez P.G., Felix F.N., Woodley D.T., Shim E.K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery*. 2008;34(9):1159–1169. DOI: 10.1177/147323000903700531.
12. Bryan N., Ahswin H., Smart N., Bayon Y., Wohlerst S., Hunt J.A. Reactive oxygen species (ROS)—a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater*. 2012;24:249–265. DOI: 10.22203/ecm.v024a18.
13. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*. 2017;14(1):89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557.
14. Musino D., Devic J., Lelong C., Luche S., Rivard C., Dalzon B., Landrot G., Rabilloud T., Capron, I. Impact of Physico-Chemical Properties of Cellulose Nanocrystal/Silver Nanoparticle Hybrid Suspensions on Their Biocidal and Toxicological Effects. *Nanomaterials*. 2021;11(7):1862. DOI: 10.3390/nano11071862.
15. Alahmad A., Feldhoff A., Bigall N.C., Rusch P., Scheper T., Walter J.G. Hypericum perforatum L.-mediated green synthesis of silver nanoparticles exhibiting antioxidant and anticancer activities. *Nanomaterials*. 2021;11(2):487. DOI: 10.3390/nano11020487.
16. Nguyen T.H.A., Nguyen V.C., Phan T.N.H., Le V.T., Vasseghian Y., Trubitsyn M.A., Nguyen A.T., Chau T.P., Doan V.D. Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe (III) ions. *Chemosphere*. 2021;287(3):132271. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132271.
17. Aboiyewa J.A., Sibuyi N.R., Meyer M., Oguntibeju O.O. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Some Selected Medicinal Plants from Southern Africa and Their Biological Applications. *Plants*. 2021;10(9):1929. DOI: 10.3390/plants10091929.
18. Zykova M.V., Schepetkin I.A., Belousov M.V., Krivoshchekov S.V., Logvinova L.A., Bratishko K.A., Yusubov M.S., Romanenko S.V., Quinn M.T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules*. 2018;23(4):753. DOI: 10.3390/molecules23040753.
19. Orlov D.S. Humus acids of soils. Rotterdam: AA Balkema; 1985. 378 p.
20. Schepetkin I., Khlebnikov A., Kwon B.S. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug development research*. 2002;57(3):140–159. DOI: 10.1002/ddr.10058.
21. Trofimova E.S., Zykova M.V., Ligacheva A.A., Sherstoboev E.Y., Zhdanov V.V., Belousov M.V., Krivoshchekov S.V., Danilets M.G., Dygai A.M. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in vitro. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;162(6):741–745. DOI: 10.1007/s10517-017-3702-5.
22. Jooné G.K., Dekker J., van Rensburg C.E.J. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 2003;58(3–4):263–267. DOI: 10.1515/znc-2003-3-421.
23. Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В., Большаков М.А., Кутенков О.П., Ростов В.В. Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*. 2010;333:161–163.
24. Laghrib F., Houcini H., Khalil F., Liba A., Bakasse M., Lahrich S., El Mhammedi M.A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Chitosan as Stabilizer Agent: Application towards Electrocatalytic Reduction of p-Nitrophenol. *ChemistrySelect*. 2020;5(3):1220–1227. DOI: 10.1002/slct.201903955.
25. Nasirizadeh N., Shekari Z., Dehghani M., Makarem S. Delphinidin immobilized on silver nanoparticles for the simultaneous determination of ascorbic acid, noradrenalin, uric acid, and tryptophan. *Journal of food and drug analysis*. 2016;24(2):406–416. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.11.011.
26. Ha D.T., Oh J., Khoi N.M., Dao T.T., Dung L.V., Do T.N.Q., Lee S.M., Jang T.S., Jeong G., Na M. In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;150(3):875–885. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.039.
27. Ye H., Luo J., Hu D., Yang S., Zhang A., Qiu Y., Ma X., Wang J., Hou J., Bai J. Total Flavonoids of *Crocus sativus* Petals Release tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in BRL-3A Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:1–15. DOI: 10.1155/2021/5453047.
28. Zavodnik I.B. Reactive oxygen species generation and B14 cells morphological transformations under oxidative treatment by organic hydroperoxide. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2015;3:104–108. (In Russ.)
29. Bedlovičová Z., Strapáč I., Baláz M., Salayová A. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecule*. 2020;25(14):3191. DOI: 10.3390/molecules25143191.
30. Aeschbacher M., Graf C., Schwarzenbach R.P., Sander M. Antioxidant properties of humic substances. *Environ Sci Technol*. 2012;46(9):4916–4925. DOI: 10.1021/es300039h.
31. Bratishko K.A., Zykova M.V., Ivanov V.V., Buyko E.E., Drygunova L.A., Perminova I.V., Belousov M.V. Peat humic acids—prospective biologically active substances with antioxidant activity for the development of protective agents. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2021;1:287–298. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021018784.
32. Klavins M., Sire J. Variations of humic acids properties within peat profiles. *Mires and peat*. 2010;4:175–197.
33. Vijilvani C., Bindhu M.R., Frincy F.C., AlSalhi M.S., Sabitha S., Saravanakumar K., Devanesan S., Umavedi M., Aljaafreh M.J., Atif M. Antimicrobial and catalytic activities of biosynthesized gold, silver and palladium nanoparticles from *Solanum nigrum* leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;202:111713. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111713.
34. Du L., Xu Q., Huang M., Xian L., Feng J.X. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Materials Chemistry and Physics*. 2015;160:40–47. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2015.04.003.
35. Hu D., Yang X., Chen W., Feng Z., Hu C., Yan F., Chen X., Qu D., Chen Z. *Rhodiola rosea* Rhizome Extract-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Potential Antioxidant and Catalytic Reduction Activities. *ACS omega*. 2021;6(38):24450–24461. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.
36. Bharadwaj K.K., Rabha B., Pati S., Choudhury B.K., Sarkar T., Gogoi S.K., Kakati N., Baishya D., Kari Z.A., Edinur H.A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Diospyros malabarica* Fruit Extract and Assessments of Their Antimicrobial, Anticancer and Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol (4-NP). *Nanomaterials*. 2021;11(8):1999. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63>
УДК 615.1



Обзорная статья / Review article

Интраназальные системы доставки *in situ*: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор)

Е. О. Бахрушина, Н. Б. Демина*, М. М. Шумкова, П. С. Родюк, Д. С. Шуликина, И. И. Краснюк

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

*Контактное лицо: Демина Наталья Борисовна. E-mail: nbd217@mail.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; М. М. Шумкова – <https://orcid.org/0000-0002-4448-2588>; П. С. Родюк – <https://orcid.org/0000-0001-8678-8051>; Д. С. Шуликина – <https://orcid.org/0000-0002-8418-6177>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 13.04.2021

Статья принята в печать: 14.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Интраназальная доставка *in situ* гелеобразующих систем является сложным, но перспективным направлением. Из-за высокой стоимости разработки нового химического объекта или генно-инженерной модификации биологических молекул фармацевтические компании сосредотачиваются на разработке технологий новых систем доставки для существующих активных фармацевтических ингредиентов с целью улучшения их эффективности и биодоступности. *In situ* системы для интраназальной доставки за счет повышенной вязкости и мукоадгезии к слизистой носа позволяют преодолевать мукоцилиарный клиренс и гарантировать полное всасывание и пролонгированное высвобождение активных фармацевтических ингредиентов.

Текст. В статье рассмотрены виды и основные преимущества интраназальных *in situ* систем доставки, показанные в доклинических исследованиях, а также подходы к технологии получения и стандартизации этих систем. Обобщены данные научных исследований в этой области за последние 15 лет, выделены наиболее перспективные полимеры для создания термообратимых и pH-чувствительных композиций, а также проанализированы современные методы оценки золь-гель перехода *in situ*.

Заключение. Применение *in situ* систем для интраназального введения позволяет обеспечивать высокую таргетность доставки синтетических и биологических молекул в мозг. В настоящее время имеются многочисленные фармакокинетические и фармакодинамические исследования на животных, подтверждающие эффективность таких систем, а также их безопасность. Наиболее востребованными для конструирования систем доставки *in situ* остаются термореверсивные коммерчески доступные и направленно синтезируемые полимеры (полоксамер 407, PLGA, NIPAAm и др.), а также хитозан. Для оценки параметров *in situ* гелеобразования широко используются *in vitro* и *ex vivo* методы со слизистой и искусственной назальной жидкостью, однако для увеличения воспроизводимости методик и улучшения корреляции *in vitro/in vivo* рекомендуется проводить моделирование носовой полости. Совершенствование технологии и методов скрининга интраназальных реверсивных систем поможет приблизиться к проведению клинических исследований и выходу этих систем доставки на мировой фармацевтический рынок.

Ключевые слова: интраназальная доставка, системы доставки, *in situ* гелеобразование, полоксамеры, хитозан, мукоадгезия

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина разрабатывала дизайн обзорной статьи. Авторы Е. О. Бахрушина, П. С. Родюк, Д. С. Шуликина участвовали в проведении научного поиска, обработке данных и их компиляции. Е. О. Бахрушина, Н. Б. Демина, М. М. Шумкова, П. С. Родюк и Д. С. Шуликина участвовали в написании текста статьи. Н. Б. Демина и И. И. Краснюк проводили рецензирование обзора и одобрение на подачу в журнал статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Демина Н. Б., Шумкова М. М., Родюк П. С., Шуликина Д. С., Краснюк И. И. Интраназальные системы доставки *in situ*: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–63. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63>

In situ Intranasal Delivery Systems: Application Prospects and Main Pharmaceutical Aspects of Development (Review)

Elena O. Bakhrushina, Natalia B. Demina*, Marina M. Shumkova, Polina S. Rodyuk,
Daria S. Shulikina, Ivan I. Krasnyuk

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

*Corresponding author: Natalia B. Demina. E-mail: nbd217@mail.ru

ORCID: Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Natalia B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Marina M. Shumkova – <https://orcid.org/0000-0002-4448-2588>; Polina S. Rodyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8678-8051>; Daria S. Shulikina – <https://orcid.org/0000-0002-8418-6177>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 13.04.2021

Revised: 14.09.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Intranasal delivery of *in situ* gel-forming systems is a complex but promising direction. Due to the high cost of developing a new chemical object or genetically engineered modification of biological molecules, pharmaceutical companies are focusing on developing technologies for new delivery systems for existing active pharmaceutical ingredients to improve their effectiveness and bioavailability. *In situ*

© Бахрушина Е. О., Демина Н. Б., Шумкова М. М., Родюк П. С., Шуликина Д. С., Краснюк И. И., 2021

© Bakhrushina E. O., Demina N. B., Shumkova M. M., Rodyuk P. S., Shulikina D. S., Krasnyuk I. I., 2021

systems for intranasal delivery, due to increased viscosity and mucoadhesion to the nasal mucosa, allow overcoming mucociliary clearance and ensuring complete absorption and prolonged release of drugs.

Text. The article discusses the main advantages of intranasal *in situ* delivery systems shown in preclinical studies, as well as approaches to the technology of obtaining and standardization of these systems. The results of scientific research in this field over the past 15 years are summarized, the most promising polymers for creating thermoreversible and pH-sensitive compositions are identified, and modern methods for evaluating the sol-gel transition *in situ* are analyzed.

Conclusion. The use of *in situ* systems for intranasal administration allows providing a high targeting of the delivery of synthetic and biological molecules to the brain. Currently, numerous pharmacokinetic and pharmacodynamic preclinical studies confirm the effectiveness of such systems, as well as their safety. Thermoreversible commercially available and directionally synthesized polymers (poloxamer 407, PLGA, NIPAAm, etc.), as well as chitosan, remain the most popular for the design of *in situ* delivery systems. *In vitro* and *ex vivo* methods with mucosa and artificial nasal fluid are widely used to assess the parameters of *in situ* gelation, but to increase the reproducibility of the methods and improve the correlation *in vitro/in vivo*, it is recommended to conduct modeling of the nasal cavity. Developing the technology and methods of screening of intranasal reversible systems will help to get closer to clinical trials and the entry of these delivery systems into the global pharmaceutical market.

Keywords: intranasal delivery, delivery systems, *in situ* gelation, poloxamers, chitosan, mucoadhesion

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

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina developed the design of the review. Authors Elena O. Bakhrushina, Polina S. Rodiuk, Daria S. Shulikina participated in the academic research, data processing, and compilation. Elena O. Bakhrushina, Natalia B. Demina, Marina M. Shumkova, Polina S. Rodiuk and Daria S. Shulikina participated in writing the text of the paper. The authors Natalia B. Demina and Ivan I. Krasniuk reviewed the paper and approved it for submission of the article to the journal. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Demina N. B., Shumkova M. M., Rodyuk P. S., Shulikina D. S., Krasnyuk I. I. *In situ* intranasal delivery systems: application prospects and main pharmaceutical aspects of development. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):54–63. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63>

ВВЕДЕНИЕ

Интраназальный способ введения – один из самых перспективных неинвазивных способов доставки лекарственных веществ в организм человека. Этот путь введения обеспечивает высокую приверженность пациентов терапии, поскольку не требует привлечения медицинского персонала, не травматичен, легко осуществим и высокоэффективен [1]. Возможность интраназального введения препаратов для обеспечения экстренной помощи используется на протяжении десятилетий медицинскими службами и службами безопасности многих стран при передозировке наркотиками, экстренной остановке сердца – как альтернатива внутривенным инъекциям [2].

В настоящее время препараты интраназального введения коммерчески доступны для синтетических субстанций (налоксон, дексаметазон и др.), а также для некоторых биопрепаратов [3, 4]. Так, интраназальная доставка вакцин успешно осуществляется благодаря относительно большой абсорбирующей поверхности и низкой протеолитической активности слизистой носа, а также в результате снижения производственных затрат по сравнению с парентеральными формами [5].

В последние годы интраназальный путь введения все чаще стал использоваться для направленной доставки лекарственных средств в мозг, так как эффективно позволяет действующим веществам преодолевать гематоэнцефалический барьер, благодаря транспорту через обонятельные пути и тройничный нерв [6].

Однако, несмотря на высокую проницаемость назальной слизистой оболочки, как правило, только активные фармацевтические ингредиенты (АФИ) с небольшой молекулярной массой (< 1000 Да) способны абсорбироваться в полости носа. Также мукоцилиарный клиренс, создающий значительное препятствие для интраназальной абсорбции, так как доза препарата может быть быстро эвакуирована из носовой полости за счет движения ресничек, а также подвергнута ферментативной деградации [5, 6]. Классические технологические приемы увеличения всасывания АФИ за счет введения в состав лекарственной формы (ЛФ) пенетраторов и поверхностно-активных веществ находят ограниченное применение в интраназальных препаратах, так как это может приводить к угнетению физиологических функций обонятельного органа [2, 5]. Таким образом, проблему интраназального введения необходимо решать с помощью разработки систем доставки, обеспечивающих продолжительную экспозицию дозы препарата на слизистой и высокую биодоступность. К таким системам относятся интраназальные *in situ* системы доставки.

«*In situ*» в переводе с латинского языка означает «в исходном месте» или «в положении». Этот термин применяется в различных областях, таких как физика, геология, медицина, строительство. Так, в химии *in situ* означает «в реакционной смеси», а в биомедицинской инженерии белковые наногели, полученные методом полимеризации *in situ*, обеспечивают универсальную платформу для хранения и высвобождения терапевтически активных белков. В медицине термин ранее

применялся для описания способа моделирования строения внутренних органов по сделанным слепкам с их поверхности [7].

В аспекте фармацевтической разработки под «*in situ* системами» понимают системы доставки, совершающие фазовый переход в определенном дизайном исследования месте организма, способные таргетно высвобождать АФИ, поддерживая его относительно постоянные концентрации за счет образования депо, обеспечивающего пролонгированность действия системы. В узком смысле *in situ* системы рассматриваются как реверсивные системы, золь-гель переход которых осуществляется локально под действием термических, химических или физико-химических факторов, определяемых физиологическими условиями места применения [3, 5, 6].

В данной обзорной статье мы рассмотрим более подробно методики, направленные на доказательство наличия гелеобразования *in situ*, сферы применения систем направленной доставки, а также более детально рассмотрим полимеры, используемые при создании систем доставки *in situ*.

Ретроспектива систем доставки *in situ*

По данным базы медицинских публикаций PubMed, первое упоминание термина *in situ* в научной литературе в аспекте локального гелеобразования датируется 1984 годом и описывает образования геля желатина в желудке крыс линии Wistar при следовании гидратно-желатиновой диеты у животных [8].

Первые научные разработки систем *in situ* доставки относятся к началу 2000-х годов. В 2001 году L. E. Bromberg опубликовал работу о применении редкоштитых акриловых полимеров (карбомеров) и полимеров полиакриловой кислоты с поверхностно-активными веществами (плюроники, полуксамеров) в системах интраназальной доставки, обладающих улучшенными свойствами. За счет биоадгезивных свойств фармацевтическая композиция на основе полуксамеров демонстрировала лучшее удерживание в полости носа, продолжительную экспозицию на модели у крыс по сравнению с карбомерами [9].

С середины 2000-х годов интерес к разработке *in situ* систем стал расти. С расширением ассортимента вспомогательных веществ и химически модифицированных полимеров возможности для фармацевтической разработки систем доставки для различных путей введения расширились.

В 2003 году была опубликована работа исследователей Корейского института науки и технологии (Сеул, Южная Корея), в которой описывается применение термочувствительных циклотрифосфазенов, содержащих этиленгликоль и сложные эфиры аминокислот в качестве боковых групп в технологии направленной доставки противоопухолевого препарата платины [10].

В исследованиях ученых университета Хаджеттепе (Анкара, Турция) впервые описывается создание вагинальной системы доставки *in situ* для клотримид-

зола на основе термочувствительной матрицы. В качестве термореверсивного полимера в исследовании использовался плюроник 127 (полуксамер 407), чьи технологические свойства были улучшены путем добавления карбомера и производного целлюлозы. Исследование E. Bilensoy et al. [11] дало начало новому направлению в технологии термореверсивных *in situ* систем – получения и изучения поликомплексов полуксамеров с различными гелеобразователями [12].

Однако, несмотря на изучение различных возможных путей введения и способов применения реверсивных смарт-систем, интраназальная доставка *in situ* по-прежнему остается самым популярным направлением исследований, число публикаций относительно которого увеличивается с каждым годом (рисунок 1).

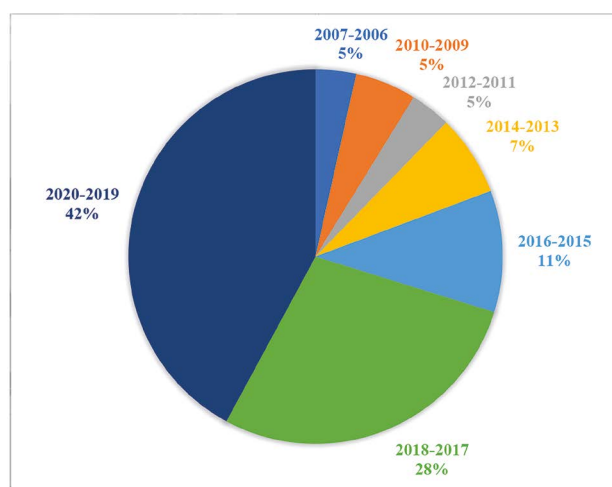


Рисунок 1. Диаграмма изменения исследовательского интереса к вопросу создания *in situ* систем интраназальной доставки (по данным PubMed; ключевые слова: «*in-situ intranasal*», «*intranasal forms for system delivery*»)

Figure 1. Diagram of changes in research interest for *in situ* intranasal delivery systems (according to PubMed; keywords: "*in-situ intranasal*", "*intranasal forms for system delivery*")

Рост исследовательского интереса к разработке интраназальных *in situ* систем связан с их преимуществами, неоднократно отмечаемыми в различных работах. Реверсивные системы обеспечивают устойчивое и пролонгированное действие препарата, улучшенную комплаентность пациента и снижение частоты введения препарата по сравнению с обычной системой доставки лекарственных средств [1, 3, 5, 6].

Интраназальные *in situ* системы могут демонстрировать большую биодоступность за счет высокой мукоадгезии и локального золь-гель перехода, которые способствуют длительной экспозиции даже в условиях мукоцилиарного клиренса. В исследованиях K.-L. Hu et al. [13] оценивалось влияние мукоцилиарного клиренса на биодоступность введения лидокаина гидрохлорида интраназально в составе систем,

представляющих собой спрей и гель. Абсолютная биодоступность назального геля лидокаина была примерно в 1,5 раза выше, чем у назального спрея, а таргентность АФИ на обонятельный канал/желудочек после введения назального геля в 1,2 раза превышала таковой показатель спрея. Был сделан вывод о том, что доставка в мозг лидокаина усиливается при использовании геля в качестве системы доставки.

Скрининг полимеров для *in situ* гелеобразования

В зависимости от рода стимула, потенцирующего фазовый переход, матрицы *in situ* систем можно разделить на термореверсивные, pH-зависимые, ионночувствительные, влагоактивизируемые и др. [1].

Выбор подходящего полимера с желаемыми потенцирующими стимулами, мукоадгезивностью, вязкостью и поведением при высвобождении лекарственного средства имеет важное значение для разработки эффективного геля *in situ*.

В современных исследованиях находят применение как природные (хитозан, желатиновая камедь, пектин и др.), так и синтетические [полоксамер (P407 и P188), карбопол и др.] стимулочувствительные полимеры [14–31].

По результатам анализа научных публикаций базы PubMed по ключевым словам «intranasal forms for system delivery» и «in-situ intranasal» были отобраны десять самых используемых для создания *in situ* систем полимеров и проранжированы в порядке убывания частоты их применения (таблица 1).

Таблица 1. Ранжирование смарт-полимеров, использующихся для создания *in situ* интраназальных систем

Table 1. Ranking of smart polymers used for *in situ* intranasal systems

Ранг Rank	Полимер/группа полимеров Polymer/Polymer Group	Доля (%) Percentage (%)
1	Полоксамеры Poloxamers	23,00
2	Хитозан Chitosan	22,00
3	Гидроксипропилметилцеллюлоза Hydroxypropyl methylcellulose	7,70
4	Сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) Polylactic-glycolic Acid (PLGA)	6,70
5	Камеди (желатиновая и конжаковая) Gums (Gellan and konjac)	5,70
6	Карбомеры Carbomers	5,70
7	Пектин Pectin	2,80
8	Альгинаты Alginates	2,80
9	Желатин Gelatin	1,90
10	Натрия гиалуронат Sodium hyaluronate	0,96

Таким образом можно заключить, что в настоящее время большинство *in situ* систем функционируют по типу термореверсивного (полоксамеры) или pH-чувствительного (хитозан, карбомеры и др.) гелеобразования.

Для коррекции и улучшения свойств готовых фармацевтических композиций зачастую используют не монокомпонентные матрицы, а смеси полимеров, обладающих идентичными или же различными механизмами *in situ*, гелеобразования [12]. Широко известна технология получения поликомплексов на основе полоксамера 407, когда для улучшения свойств биоадгезии в матрицу геля полоксамера добавляют мукоадгезивные полимеры с молекулярным весом выше 100 кДа, такие как редкосшитые акриловые полимеры карбополы, хитозан, а также различные производные целлюлозы: натрий-карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу и метилцеллюлозу [1].

Наряду с использованием коммерчески доступных полимеров для создания *in situ* систем также востребован направленный синтез полимеров, удовлетворяющих конкретным запросам исследователя.

Группой исследователей Аризонского университета (США) под руководством Baе Hoоп Lee был проведен направленный синтез полимера для получения *in situ* интраназальной системы. Полученный полимер N-изопропилакриламида на основе 2-гидроксиэтил-метакриллактата и акриловой кислоты (NIPAAm) был термореверсивен и мукоадгезивен, а также не обладал острой и хронической токсичностью [32–34]. Температура гелеобразования NIPAAm составляла 37 °С, что превышает таковую у самого известного термореверсивного полимера – полоксамера 407 (около 26 °С).

In vivo исследования интраназальных *in situ* систем

В последние годы с ростом количества фармацевтических разработок систем интраназальной *in situ* доставки появляются все больше опубликованных данных доклинических исследований, демонстрирующих эффективность и безопасность таких систем [16, 20, 21, 35–38].

Одно из первых исследований было проведено в 2014 году в двух крупнейших медицинских центрах Китая – Харбинском и Фуданьском университетах. Группе исследователей под руководством Ch. Li удалось создать стабильную термореверсивную композицию на основе полоксамера 407 и каррагинана для направленной доставки кеторолака трометамин [35]. Фармакокинетическое исследование интраназальной системы доставки на крысах продемонстрировало повышенную абсолютную биодоступность ($68,8 \pm 23,3\%$) и увеличенное среднее время экспозиции ($8,8 \pm 3,5$ часа) *in situ* геля по сравнению с интраназальным спреем ($24,8 \pm 13,8\%$, $3,9 \pm 0,6$ часа).

В университете Квинсленда (Австралия) были проведены комплексные исследования по изучению безопасности *in situ* системы интраназальной доставки дексаметазона [36]. Путем проведения систематических исследований цитотоксичности с использованием обнаружения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) не было выявлено повышения по сравнению с исходным уровнем ЛДГ, при этом сохранялась целостность ткани эксплантированной слизистой оболочки носа человека, что было дополнительно подтверждено гистопатологическим исследованием тканей. Полученные Р. Pandey et al. результаты указывают на безопасность системы доставки и пролонгированный эффект за счет депонирования лекарственного средства в слизистой оболочке носа человека.

В работе N. Ahmad et al. [37] оценивались фармакокинетические параметры назального *in situ* геля, содержащего наноэмульсию нарингенина, созданного на основе термореверсивного поликомплекса полоксамера 407 и хитозана. В ходе исследования сравнивали интраназальное введение разработанной системы доставки с внутримышечным введением референтного препарата. *In situ* гель увеличивал биодоступность нарингенина в пределах ЦНС. У крыс с церебральной ишемией значительно улучшилась нейроповеденческая активность (двигательная активность и сила захвата), за которой последовала антиоксидантная активность. Проведенные исследования токсичности установили безопасный профиль системы интраназальной доставки.

Совместные международные исследования Института фармацевтических наук и исследований (Нью-Дели, Индия) и университета Короля Сауда (Саудовская Аравия) препарата ралоксифена гидрохлорида в форме интраназального *in situ* геля, предназначенного для лечения остеопороза, продемонстрировали 7,4-кратное улучшение биодоступности АФИ по сравнению с зарегистрированным препаратом ралоксифена гидрохлорида в таблетированной форме для перорального приема. Исследования фармакодинамики *in vivo* также показали, что плотность костной ткани после применения интраназальной системы доставки была увеличена на 162 % и значительно улучшены биохимические маркеры по сравнению с пероральным приемом таблеток ралоксифена гидрохлорида [38].

В работе S. S. Bachhav et al. [16] изучалась возможность создания таргетной медуллярной системы на основе *in situ* интраназальной формы диазепама, переходящей в мукоадгезивный гель при контакте с небольшими количествами воды. Препарат был разработан в качестве альтернативы инвазивному введению при эпилептических припадках. В фармакокинетических исследованиях на модели крыс, где в качестве референтного препарата использовался спрей диазепама, было показано, что высвобождение АФИ из системы доставки (рН 6,4) за 10 минут достигало 50 % и продолжалось в течение 1 часа. Абсолютная биодоступность составляла 50 % как при интраназальном введении референтного препарата, так и системы

in situ доставки. Интраназальное введение диазепама показало немедленное всасывание с быстрой и высокой концентрацией АФИ во внеклеточной жидкости головного мозга по сравнению с внутривенным введением раствора диазепама. Потенциал направленной доставки системы *in situ* в 2 раза превышал таковой при интраназальном введении спрея диазепама, что исследователи объясняли мукоадгезивными и микроэмульсионными свойствами системы доставки.

В работе Y. Sun et al. [20] описан метод получения *in situ* системы медуллярной таргетной доставки паеонла – фенольного соединения, выделяемого из растений рода Пион, применяемого в китайской медицине. Механизм *in situ* – гелеобразования был основан на применении ионно-чувствительной гидроксипропилметилцеллюлозы. Для изучения движения и распределения АФИ на крысах были использованы флуоресцентные метки. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции клеток в течение 1, 4 и 6 ч составило 1841 ± 24 , 2261 ± 27 и 2757 ± 22 соответственно. *In situ* гель, нагруженный твердыми липидными частицами с флуоресцентными метками, эффективно накапливался в области мозга после введения через обонятельную область, и флуоресцентный ответ наблюдали в обонятельной луковице, мозжечке и полосатом теле.

Интраназальные *in situ* формы не только с синтетическими АФИ, но и с иммунобиологическими, а также пептидными субстанциями демонстрируют превосходство в фармакокинетических исследованиях. В последнем исследовании M. J. Majcher et al. [21] гидрогелевые системы доставки *in situ* на основе модифицированного хитозана, нагруженные положительным аллостерическим модулятором дофаминового рецептора D_2 , показывали пролонгированный эффект при интраназальном введении (до 72 часов) на индуцированной МК-801 доклинической модели шизофрении на крысах даже при низкой дозировке препарата (0,5 мг/кг). Для сравнения, обычное введение пептидного препарата внутрибрюшинным путем требует удвоенной дозы АФИ для достижения терапевтического эффекта, который сохраняется всего несколько часов.

К сожалению, несмотря на многочисленные исследования фармакокинетики на этапах доклиники, до настоящего момента не проводились полноценные клинические исследования систем интраназальной доставки *in situ* [5]. Одни из первых шагов в этом направлении осуществляются международной командой ученых из Индии и Саудовской Аравии [38].

Доказательство наличия гелеобразования *in situ*

Критическим параметром *in situ* систем, который необходимо оценивать в процессе разработки и использовать для скрининга экспериментальных составов, является доказательство протекания таргетного *in situ* гелеобразования.

Для оценки этого показателя наиболее часто применяют *in vitro* и *ex vivo* методы [13,18, 24, 39–45].

Ex vivo методы используются для определения мукоадгезивной составляющей *in situ* форм, так как было показано, что величина мукоадгезии имеет тенденцию к резкому возрастанию при фазовом переходе [13]. К основным показателям мукоадгезии относятся прочность и время мукоадгезии [39, 40].

В исследовании H. F. Salem et al. [18] в качестве *ex vivo* модели использовали интактную слизистую оболочку носовой ткани овец, полученную в течение 1 ч после забоя животного. Изолированную слизистую оболочку очищали в 0,9%-м растворе хлорида натрия. Для изучения прочности мукоадгезии участки слизистой оболочки носа, отобранные для исследования (размером $2,5 \times 1 \text{ см}^2$), фиксировали на предметном стекле с помощью цианоакрилатного клея и гравиметрически определяли силу отрыва тканей с равномерно распределенным между ними образцом *in situ* геля (массой 1,0 г) друг от друга [18].

Время мукоадгезии также определяют на слизистой оболочке носа свежезабитого мелкого рогатого скота *ex vivo*, прошедшей предварительную обработку раствором, имитирующим назальную жидкость. Срезы слизистой оболочки фиксируют на стеклянном стакане со слизистой поверхностью, обращенной наружу. Небольшое количество назального *in situ* геля помещали на поверхность слизистой оболочки, после чего полученную модель помещали в ячейку, содержащую 100 мл раствора-имитации назальной жидкости, и подвергали медленному перемешиванию при 10 оборотах в минуту. Время, необходимое для эрозии геля *in situ*, было отмечено визуально и рассматривалось как время *in vitro* мукоадгезии [41].

Назальная жидкость, использовавшаяся в экспериментах P. Asha et al., широко применяется для изучения и других показателей *in situ* интраназальных систем. Ее состав подробно описывается в работе H. S. Mahajan и S. Gattani [42]. В качестве имитации назальной жидкости используется водный раствор, содержащий 8,77 мг/мл NaCl, 2,98 мг/мл KCl и 0,59 мг/мл CaCl_2 , на литр, pH $6 \pm 0,1$.

In vitro методы, использующиеся для изучения *in situ* поведения интраназальных систем, применяются как для оценки термореверсивных матриц, так и для систем, обеспечивающих фазовый переход другим методом.

В среде искусственной назальной жидкости, термостатируемой при различных температурах (от 33 до 37 °C в различных исследованиях [18, 43–45]), золь-гель переход, необходимый для *in situ* гелеобразования, фиксируется визуально или инструментальными методами – с помощью цифровой вискозиметрии [43–45].

В работе S. Mohamed et al. [24] для оптимизации визуальной оценки гелеобразования предлагается ввести критерий для оценивания. Гель *in situ* оценивался как (–), если гелеобразование не происходило,

и оценивался как (+), если гель образовался через несколько минут и быстро растворился. Степень (++) регистрировалась, если гель образовывался немедленно и оставался в течение нескольких часов, и (+++), когда гель образовывался немедленно и оставался в течение длительного периода времени.

Параметрами дополнительной оценки являются время гелеобразования и прочность образуемого геля.

За параметр *времени гелеобразования* в исследовании H. F. Salem et al. [18] принимали время, за которое в среде искусственной назальной жидкости *in situ* система достигала вязкости, останавливающей вращение магнитного стержня, помещенного в измерительный сосуд, при установке его на магнитную мешалку с подогревом (скорость перемешивания 30 об/мин, температура 34 °C).

В работе H. Gholizadeh et al. [44] время гелеобразования предлагалось оценивать визуально при инкубировании пробирок с гелем на водяной бане (температура 37 °C). Время образования геля регистрировали, когда в наклоненной пробирке не наблюдалось течения. Оптимальным временем гелеобразования в этом исследовании называется интервал длительностью до 15 минут.

Прочность гелеобразования является дополнительным скрининговым параметром, оценивающим способность *in situ* систем противостоять мукоцилиарному клиренсу. В исследовании [18] для оценки этого показателя 25 г мукоадгезивного геля помещали в мерный цилиндр объемом 50 мл и инкубировали при температуре 34 °C. Затем на поверхность геля помещали груз весом 17 г. Время, необходимое этому грузу для проникновения на 5 см в мукоадгезивный гель, определяли как прочность геля.

Температура гелеобразования является обязательным параметром при выборе составов термореверсивных систем. В различных работах эту характеристику предлагается оценивать любыми доступными методами (при нагревании на водяной бане, магнитной мешалке или термостатировании в климатической камере), используя термометр или термодатчик для фиксации температуры. Завершение фазового перехода, как и в случае с определением времени гелеобразования, фиксируют визуальными или инструментальными методами, а также по остановке мешалки в случае использования магнитной мешалки [18].

Несмотря на многообразие описанных в научной литературе методов исследования *in situ* гелеобразования, все они, тем не менее, являются низкопроизводимыми и имитируют физиологические особенности носовой полости с разной степенью достоверности.

В качестве альтернативы или дополнения имеющимся *ex vivo/in vitro* методам ведутся работы по *in vitro* моделированию носовой полости. Такие модели помогут стандартизировать методики исследования, а также учитывать больше физиологических условий:

не только ионный состав, мукозу и температуру, но и геометрию, площадь поверхности и угол наклона слизистых оболочек носовой полости [46–55].

In vitro моделирование носовой полости

Современные *in vitro* модели носовой полости используются как для изучения распределения классических жидких интраназальных ЛФ, но особый потенциал имеют для моделирования процесса *in situ* гелеобразования рассматриваемых систем доставки [46–55].

Трехмерные модели создаются на основе данных компьютерной томографии, акустической ринометрии и магнитно-резонансной томографии здоровых пациентов [47–53]. Разработанные модели применяются как для иллюстрирования процессов распределения частиц вводимых интраназально АФИ [52] для измерения площади поверхности назальных спреев [54], так и для оценки влияния мукоцилиарного клиренса на интраназальные лекарственные препараты [48].

In vitro модели часто представляют собой 3D-макеты носовой полости, выполненные по технологии 3D-печати [55] или силиконовые формы, коррелирующие с физиологическим строением полости носа [54]. Для моделирования тех или иных процессов в состав модели может включаться искусственная назальная жидкость, муциновый слой или направленный воздушный поток, а также постоянная температура [49–55].

Для оценки измеряемых показателей может быть предложено использовать метод визуализации. Так, в исследовании V. Kundoor и R. N. Dalby [54] после использования силиконовой модели носовой полости человека (Koken Co., Ltd.) для определения распределения назального спрея проводилась обработка полученных данных в программе Adobe Photoshop, а интерпретация результатов выполнялась путем расчета площади поверхности распределения.

Таким образом, создание стандартизированной модели носовой полости для использования ее в качестве скринингового метода определения *in situ* гелеобразования является, на наш взгляд, очень перспективным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение *in situ* систем для интраназального введения позволяет обеспечивать высокую таргетность доставки синтетических и биологических молекул в мозг. В настоящее время имеются многочисленные фармакокинетические и фармакодинамические исследования на животных, подтверждающие эффективность таких систем, а также их безопасность. Наиболее востребованными для конструирования систем доставки *in situ* остаются термореверсивные коммерчески доступные и направленно синтезируемые полимеры (полоксамер 407, PLGA, NIPAAm и др.), а также хитозан. Для оценки параметров *in situ* геле-

образования широко используются *in vitro* и *ex vivo* методы со слизистой и искусственной назальной жидкостью, однако для увеличения воспроизводимости методик и увеличения корреляции *in vitro/in vivo* рекомендуется проводить моделирование носовой полости. Совершенствование технологии и методов скрининга интраназальных реверсивных систем поможет приблизиться к проведению клинических исследований и выходу этих систем доставки на мировой фармацевтический рынок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Н. Б., Бахрушина Е. О., Бардаков А. И., Краснюк И. И. Биофармацевтические аспекты дизайна интраназальных лекарственных форм. *Фармация*. 2019;68(3):12–17.
2. Suman J. D., Laube B. L., Lin T.-Ch., Brouet G., Dalby R. Validity of *in vitro* tests on aqueous spray pumps as surrogates for nasal deposition. *Pharm Res*. 2002;19(1):1–6. DOI: 10.1023/a:1013643912335.
3. Rohrer J., Lupo N., Bernkop-Schnürch A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):8–20. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.029.
4. Bariev E. A., Krasnyuk I. I., Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Smirnov V. V., Bardakov A. I., Demina N. B., Krasnyuk (Jr.) I. I. Study of the acute toxicity of a new dosage form of naloxone hydrochloride for intranasal administration. *Drug Research*. 2020;70(1):23–25. DOI: 10.1055/a-0899-4948.
5. Singh R. M. P., Kumar A., Pathak K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2013;10(1):115–130. DOI: 10.1517/17425247.2013.746659.
6. Agrawal M., Saraf Sh., Saraf S., Dubey S. K., Puri A., Gupta U., Kesharwani P., Ravichandiran V., Kumar P., Naidu V. G. M., Murty U. S., Ajazuddin, Alexander A. Stimuli-responsive *in situ* gelling system for nose-to-brain drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:235–265. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.044.
7. Birmingham A. The topographical anatomy of the spleen, pancreas, duodenum, kidneys, &c: illustrated by a cast of these viscera hardened *in situ*. *J Anat Physiol*. 1896;31(1):95–113.
8. De Bethizy J. D., Street J. C. Unique purified hydrated-gelatin diet for feeding dietary fiber to Wistar rats. *Lab Anim Sci*. 1984;34(1):44–48.
9. Bromberg L. E. Enhanced nasal retention of hydrophobically modified polyelectrolytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;53(1):109–114. DOI: 10.1211/0022357011775082.
10. Song S.-Ch., Lee S. B., Lee B. H., Ha H.-W., Lee K.-T., Sohn Y. S. Synthesis and antitumor activity of novel thermosensitive platinum(II)-cyclotriphosphazene conjugates. *Journal of Controlled Release*. 2003;90(3):303–311. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00199-8.
11. Bilensoy E., Rouf M. A., Vural I., Sen M., Hincal A. A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E54. DOI: 10.1208/pt070238.
12. Бахрушина Е. О., Никифорова Д. А., Демина Н. Б. Основные аспекты разработки термореверсивных поликомплексов полоксамеров. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2018;20(5):103–106. DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-5-103-106.
13. Hu K.-L., Mei N., Feng L., Jiang X.-G. Hydrophilic nasal gel of lidocaine hydrochloride. 2nd communication: Improved bioavailability and brain delivery in rats with low ciliotoxicity. *Arzneimittelforschung*. 2009;59(12):635–640. DOI: 10.1055/s-0031-1296452.
14. Zhang L., Pang L., Zhu S., Ma J., Li R., Liu Y., Zhu L., Zhuang X., Zhi W., Yu X., Du L., Zuo H., Jin Y. Intranasal tetrandrine temperature-sensitive *in situ* hydrogels for the treatment of micro-wave-induced brain injury. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;583:119384. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119384.
15. Wang Q.-S., Li K., Gao L.-N., Zhang Y., Lin K.-M., Cui Y.-L. Intranasal delivery of berberine via *in situ* thermoresponsive hydrogels with non-invasive therapy exhibits better antidepressant-like effects. *Biomaterials Science*. 2020;8(10):2853–2865. DOI: 10.1039/c9bm02006c.

16. Bachhav S. S., Dighe V., Mali N., Gogtay N. J., Thatte U. M., Deva-
rajan D. V. Nose-to-brain delivery of diazepam from an intranasal
aqua-triggered in-situ (ATIS) gelling microemulsion: monitoring
brain uptake by microdialysis. *European Journal of Drug Meta-
bolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):785–799. DOI: 10.1007/
s13318-020-00641-5.
17. Yin P., Li H., Ke Ch., Cao G., Xin X., Hu J., Cai X., Li L., Liu H., Du B.
Intranasal delivery of immunotherapeutic nanoformulations
for treatment of glioma through in situ activation of immune
response. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:1499–
1515. DOI: 10.2147/IJN.S240551.
18. Salem H. F., Kharshoum R. M., Abou-Taleb H. A., Naguib D. M. Na-
nosized transferosome-based intranasal in situ gel for brain tar-
geting of resveratrol: formulation, optimization, in vitro evalua-
tion, and in vivo pharmacokinetic study. *AAPS PharmSciTech*.
2019;20(5):181. DOI: 10.1208/s12249-019-1353-8.
19. Wang Q., Wong Ch.-H., Chan H.Y.E., Lee W.-Y., Zuo Zh. Statistical
design of experiment (DoE) based development and optimization
of DB213 in situ thermosensitive gel for intranasal delivery.
International Journal of Pharmaceutics. 2018;539(1–2):50–57. DOI:
10.1016/j.ijpharm.2018.01.032.
20. Sun Y., Li L., Xie H., Wang Y., Gao Sh., Zhang L., Bo F., Yang Sh.,
Feng A. Primary studies on construction and evaluation of
ion-sensitive in situ gel loaded with paeonol-solid lipid nanopar-
ticles for intranasal drug delivery. *International Journal of Nano-
medicine*. 2020;15:3137–3160. DOI: 10.2147/IJN.S247935.
21. Majcher M. J., Babar A., Lofts A., Leung A., Li X., Abu-Hijleh F.,
Smeets N. M. B., Mishra R. K., Hoare T. In situ-gelling starch nano-
particle (SNP)/O-carboxymethyl chitosan (CMCh) nanoparticle
network hydrogels for the intranasal delivery of an antipsycho-
tic peptide. *Journal of Controlled Release*. 2021;330:738–752. DOI:
10.1016/j.jconrel.2020.12.050.
22. Rajput A., Bariya A., Allam A., Othman S., Butani S. B. In situ
nanostructured hydrogel of resveratrol for brain targeting: in
vitro-in vivo characterization. *Drug Delivery and Translational Re-
search*. 2018;8(5):1460–1470. DOI: 10.1007/s13346-018-0540-6.
23. Ball J. P., Springer M. J., Ni Y., Finger-Baker I., Martinez J., Hahn J.,
Suber J. F., DiMarco A. V., Talton J. D., Cobb R. R. Intranasal delivery
of a bivalent norovirus vaccine formulated in an in situ gelling
dry powder. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177310. DOI: 10.1371/journal.
pone.0177310.
24. Mohamed S., Nasr M., Salama A., Refai H. Novel lipid-polymer hyb-
rid nanoparticles incorporated in thermosensitive in situ gel for
intranasal delivery of terbutaline sulphate. *Journal of Microencapsu-
lation*. 2020;37(8):577–594. DOI: 10.1080/02652048.2020.1826590.
25. Mathure D., Madan J. R., Gujar K. N., Tupsamundre A., Ranpi-
se H. A., Dua K. Formulation and evaluation of niosomal in situ na-
sal gel of a serotonin receptor agonist, buspirone hydrochloride
for the brain delivery via intranasal route. *Pharmaceutical Nano-
technology*. 2018;6(1):69–78. DOI: 10.2174/22117385066661801301
05919.
26. Sherje A. P., Londhe V. Development and evaluation of pH-respon-
sive cyclodextrin-based in situ gel of paliperidone for intranasal
delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(1):384–394. DOI: 10.1208/
s12249-017-0844-8.
27. Chen Y., Liu Y., Xie J., Zheng Q., Yue P., Chen L., Hu P., Yang M.
Nose-to-brain delivery by nanosuspensions-based in situ gel for
brevescapine. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:10435–
10451. DOI: 10.2147/IJN.S265659.
28. Akilo O. D., Kumar P., Choonara Y. E., du Toit L. C., Pradeep P.,
Modi G., Pillay V. In situ thermo-co-electroresponsive mucogel for
controlled release of bioactive agent. *International Journal of Phar-
maceutics*. 2019;559:255–270. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.044.
29. Qian Sh., Wong Y. Ch., Zuo Zh. Development, characterization and
application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine.
International Journal of Pharmaceutics. 2014;468(1–2):272–282.
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.04.015.
30. Salatin S., Barar J., Barzegar-Jalali M., Adibkia Kh., Jelvehgari M.
Thermosensitive in situ nanocomposite of rivastigmine hydro-
gen tartrate as an intranasal delivery system: Development, char-
acterization, ex vivo permeation and cellular studies. *Colloids
and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;159:629–638. DOI: 10.1016/j.
colsurfb.2017.08.031.
31. Patil R. P., Pawara D. D., Gudewar Ch. S., Tekade A. R. Nanostruc-
tured cubosomes in an in situ nasal gel system: an alterna-
tive approach for the controlled delivery of donepezil HCl to
brain. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(3):264–273. DOI:
10.1080/08982104.2018.1552703.
32. Lee B. H., West B., McLemore R., Pauken Ch., Vernon B. L. In-situ
injectable physically and chemically gelling NIPAAm-based copo-
lymer system for embolization. *Biomacromolecules*. 2006;7(6):2059–
2064. DOI: 10.1021/bm060211h.
33. Lee B. H., Vernon B. In situ-gelling, erodible N-isopropylacrylamide
copolymers. *Macromolecular Bioscience*. 2005;5(7):629–635. DOI:
10.1002/mabi.200500029.
34. Lee B. H., Beart H. H., Cheng V., McLemore R., Robb S. A., Cui Zh.,
Dovigi A., Vernon B. L. In vitro and in vivo demonstration of
physically and chemically in situ gelling NIPAAm-based copoly-
mer system. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*.
2013;24(13):1575–1588. DOI: 10.1080/09205063.2013.781939.
35. Li Chen., Li Chun., Liu Zh., Li Q., Yan X., Liu Y., Lu W. Enhancement
in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal in situ
hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan. *International
Journal of Pharmaceutics*. 2014;474(1–2):123–133. DOI: 10.1016/j.
ijpharm.2014.08.023.
36. Pandey P., Pandey S., Cabot P. J., Wallwork B., Panizza B. J., Pa-
rek H. S. Toxicity evaluation and nasal mucosal tissue deposition
of dexamethasone-infused mucoadhesive in situ nasal gelling
systems. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(7):914–919. DOI:
10.1016/j.jsps.2019.06.005.
37. Ahmad N., Ahmad R., Ahmad F. J., Ahmad W., Alam M. A., Amir M.,
Ali A. Poloxamer-chitosan-based Naringenin nanoformulation
used in brain targeting for the treatment of cerebral ischemia.
Saudi Journal of Biological Sciences. 2020;27(1):500–517. DOI:
10.1016/j.sjbs.2019.11.008.
38. Zakir F., Ahmad A., Farooq U., Mirza M. A., Tripathi A., Singh D.,
Shakeel F., Mohapatra S., Ahmad F. J., Kohli K. Design and devel-
opment of a commercially viable in situ nanoemulgel for the
treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nanomedicine*.
2020;15(12):1167–1187. DOI: 10.2217/nmm-2020-0079.
39. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные
лекарственные формы. *Химико-фармацевтический журнал*.
2009;43(4):21–29.
40. Bakhrušina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastop-
china O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative study of the mu-
coadhesive properties of polymers for pharmaceutical use. *Open
Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020; 8(A):639–645.
DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
41. Paul A., Fathima K. M., Nair S. C. Intra nasal in situ gelling sys-
tem of lamotrigine using ion activated mucoadhesive polymer.
The Open Medicinal Chemistry Journal. 2017;11(1):222–244. DOI:
10.2174/1874104501711010222.
42. Mahajan, H. S. Gattani S. In situ gels of Metoclopramide Hydroch-
loride for intranasal delivery: In vitro evaluation and in vivo phar-
macokinetic study in rabbits. *Drug Delivery*. 2010;17(1):19–27. DOI:
10.3109/10717540903447194.
43. Kulkarni J. A., Avachat A. M. Pharmacodynamic and pharma-
cokinetic investigation of cyclodextrin-mediated asenapine
maleate in situ nasal gel for improved bioavailability. *Drug De-
velopment and Industrial Pharmacy*. 2017;43(2):234–245. DOI:
10.1080/03639045.2016.1236808.
44. Gholizadeh H., Cheng Sh., Pozzoli M., Messerotti E., Traini D.,
Young P., Kourmatzis A., Ong H. X. Smart thermosensitive chitosan
hydrogel for nasal delivery of ibuprofen to treat neurological
disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019;16(4):453–466.
DOI: 10.1080/17425247.2019.1597051.
45. Uppuluri Ch. T., Ravi P. R., Dalvi A. V., Shaikh Sh. Sh., Kale S. R.
Piribedil loaded thermo-responsive nasal in situ gelling system for
enhanced delivery to the brain: formulation optimization, physi-
cal characterization, and in vitro and in vivo evaluation. *Drug De-
livery and Translational Research*. 2021;11(3):909–926. DOI: 10.1007/
s13346-020-00800-w.
46. Le Guellec S., Ehrmann S., Vecellio L. In vitro – in vivo correlation
of intranasal drug deposition. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
2021;170:340–352. DOI: 10.1016/j.addr.2020.09.002.

47. Keustermans W., Huysmans T., Danckaers F., Zarowski A., Schmelzer B., Sijbers J., Dirckx J. J. J. High quality statistical shape modelling of the human nasal cavity and applications. *Royal Society Open Science*. 2018;5(12):181558. DOI: 10.1098/rsos.181558.
48. Möller W., Celik G., Feng Sh., Bartenstein P., Meyer G., Eickelberg O., Schmid O., Tatkov S. Nasal high flow clears anatomical dead space in upper airway models. *Journal of Applied Physiology*. 2015;118(12):1525–1532. DOI: 10.1152/jappphysiol.00934.2014.
49. Liu Y., Johnson M. R., Matida E. A., Kherani S., Marsan J. Creation of a standardized geometry of the human nasal cavity. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(3):784–795. DOI: 10.1152/jappphysiol.90376.2008.
50. Corey J. P., Gungor A., Nelson R., Fredberg J., Lai V. A Comparison of the nasal cross-sectional areas and volumes obtained with acoustic rhinometry and magnetic resonance imaging. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 1997;117(4):349–354. DOI: 10.1016/S0194-5998(97)70125-6.
51. Cheng K.-H., Cheng Y.-S., Yeh H.-Ch., Guilmette R. A., Simpson S. Q., Yang Y.-H., Swift D. L. In vivo measurements of nasal airway dimensions and ultrafine aerosol deposition in the human nasal and oral airways. *Journal of Aerosol Science*. 1996;27(5):785–801. DOI: 10.1016/0021-8502(96)00029-8.
52. Calmet H., Inthavong K., Eguzkita B., Lehmkuhl O., Houzeaux G., Vázquez M. Nasal sprayed particle deposition in a human nasal cavity under different inhalation conditions. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221330. DOI: 10.1371/journal.pone.0221330.
53. Chen J. Z., Kiaee M., Martin A. R., Finlay W. H. In vitro assessment of an idealized nose for nasal spray testing: Comparison with regional deposition in realistic nasal replicas. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;582:119341. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119341.
54. Kundoor V., Dalby R. N. Assessment of nasal spray deposition pattern in a silicone human nose model using a color-based method. *Pharmaceutical Research*. 2010;27(1):30–36. DOI: 10.1007/s11095-009-0002-4.
55. Warnken Z. N., Smyth H. D. C., Davis D. A., Weitman S., Kuhn J. G., Williams R. O. Personalized medicine in nasal delivery: The use of patient-specific administration parameters to improve nasal drug targeting using 3D-printed nasal replica casts. *Molecular Pharmaceutics*. 2018;15(4):1392–1402. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00702.
9. Bromberg L. E. Enhanced nasal retention of hydrophobically modified polyelectrolytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;53(1):109–114. DOI: 10.1211/0022357011775082.
10. Song S.-Ch., Lee S. B., Lee B. H., Ha H.-W., Lee K.-T., Sohn Y. S. Synthesis and antitumor activity of novel thermosensitive platinum(II)–cyclotriphosphazene conjugates. *Journal of Controlled Release*. 2003;90(3):303–311. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00199-8.
11. Bilensoy E., Rouf M. A., Vural I., Sen M., Hincal A. A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E54. DOI: 10.1208/pt070238.
12. Bakhrushina E. O., Nikiforova D. A., Demina N. B. The main aspects of the thermoreversible polycomplexes of poloxamers developing. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and education in the XXI century*. 2018;20(5):103–106. DOI: 10.26787/nyd-ha-2226-7425-2018-20-5-103-106. (In Russ.)
13. Hu K.-L., Mei N., Feng L., Jiang X.-G. Hydrophilic nasal gel of lidocaine hydrochloride. 2nd communication: Improved bioavailability and brain delivery in rats with low ciliotoxicity. *Arzneimittelforschung*. 2009;59(12):635–640. DOI: 10.1055/s-0031-1296452.
14. Zhang L., Pang L., Zhu S., Ma J., Li R., Liu Y., Zhu L., Zhuang X., Zhi W., Yu X., Du L., Zuo H., Jin Y. Intranasal tetrandrine temperature-sensitive in situ hydrogels for the treatment of micro-wave-induced brain injury. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;583:119384. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119384.
15. Wang Q.-S., Li K., Gao L.-N., Zhang Y., Lin K.-M., Cui Y.-L. Intranasal delivery of berberine via in situ thermoresponsive hydrogels with non-invasive therapy exhibits better antidepressant-like effects. *Biomaterials Science*. 2020;8(10):2853–2865. DOI: 10.1039/c9bm02006c.
16. Bachhav S. S., Dighe V., Mali N., Gogtay N. J., Thatte U. M., Deva-
rajan D. V. Nose-to-brain delivery of diazepam from an intranasal aqua-triggered in-situ (ATIS) gelling microemulsion: monitoring brain uptake by microdialysis. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):785–799. DOI: 10.1007/s13318-020-00641-5.
17. Yin P., Li H., Ke Ch., Cao G., Xin X., Hu J., Cai X., Li L., Liu H., Du B. Intranasal delivery of immunotherapeutic nanoformulations for treatment of glioma through in situ activation of immune response. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:1499–1515. DOI: 10.2147/IJN.S240551.
18. Salem H. F., Kharshoum R. M., Abou-Taleb H. A., Naguib D. M. Nanosized transferosome-based intranasal in situ gel for brain targeting of resveratrol: formulation, optimization, in vitro evaluation, and in vivo pharmacokinetic study. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(5):181. DOI: 10.1208/s12249-019-1353-8.
19. Wang Q., Wong Ch.-H., Chan H.Y.E., Lee W.-Y., Zuo Zh. Statistical design of experiment (DoE) based development and optimization of DB213 in situ thermosensitive gel for intranasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;539(1–2):50–57. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.032.
20. Sun Y., Li L., Xie H., Wang Y., Gao Sh., Zhang L., Bo F., Yang Sh., Feng A. Primary studies on construction and evaluation of ion-sensitive in situ gel loaded with paeonol-solid lipid nanoparticles for intranasal drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:3137–3160. DOI: 10.2147/IJN.S247935.
21. Majcher M. J., Babar A., Lofts A., Leung A., Li X., Abu-Hijleh F., Smeets N. M. B., Mishra R. K., Hoare T. In situ-gelling starch nanoparticle (SNP)/O-carboxymethyl chitosan (CMCh) nanoparticle network hydrogels for the intranasal delivery of an antipsychotic peptide. *Journal of Controlled Release*. 2021;330:738–752. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.12.050.
22. Rajput A., Bariya A., Allam A., Othman S., Butani S. B. In situ nanostructured hydrogel of resveratrol for brain targeting: in vitro-in vivo characterization. *Drug Delivery and Translational Research*. 2018;8(5):1460–1470. DOI: 10.1007/s13346-018-0540-6.
23. Ball J. P., Springer M. J., Ni Y., Finger-Baker I., Martinez J., Hahn J., Suber J. F., DiMarco A. V., Talton J. D., Cobb R. R. Intranasal delivery of a bivalent norovirus vaccine formulated in an in situ gelling dry powder. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177310. DOI: 10.1371/journal.pone.0177310.

REFERENCES

1. Demina N. B., Bakhrushina E. O., Bardakov A. I., Krasnyuk I. I. Design of intranasal dosage forms: biopharmaceutical aspects. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2019;68(3):12–17. (In Russ.)
2. Suman J. D., Laube B. L., Lin T.-Ch., Brouet G., Dalby R. Validity of in vitro tests on aqueous spray pumps as surrogates for nasal deposition. *Pharm Res*. 2002;19(1):1–6. DOI: 10.1023/a:1013643912335.
3. Rohrer J., Lupo N., Bernkop-Schnürch A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):8–20. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.029.
4. Bariev E. A., Krasnyuk I. I., Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Smirnov V. V., Bardakov A. I., Demina N. B., Krasnyuk (Jr.) I. I. Study of the acute toxicity of a new dosage form of naloxone hydrochloride for intranasal administration. *Drug Research*. 2020;70(1):23–25. DOI: 10.1055/a-0899-4948.
5. Singh R. M. P., Kumar A., Pathak K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2013;10(1):115–130. DOI: 10.1517/17425247.2013.746659.
6. Agrawal M., Saraf Sh., Saraf S., Dubey S. K., Puri A., Gupta U., Kesharwani P., Ravichandiran V., Kumar P., Naidu V. G. M., Murty U. S., Ajazuddin, Alexander A. Stimuli-responsive in situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:235–265. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.044.
7. Birmingham A. The topographical anatomy of the spleen, pancreas, duodenum, kidneys, &c: illustrated by a cast of these viscera hardened in situ. *J Anat Physiol*. 1896;31(1):95–113.
8. De Bethizy J. D., Street J. C. Unique purified hydrated-gelatin diet for feeding dietary fiber to Wistar rats. *Lab Anim Sci*. 1984;34(1):44–48.

24. Mohamed S., Nasr M., Salama A., Refai H. Novel lipid-polymer hybrid nanoparticles incorporated in thermosensitive in situ gel for intranasal delivery of terbutaline sulphate. *Journal of Microencapsulation*. 2020;37(8):577–594. DOI: 10.1080/02652048.2020.1826590.
25. Mathure D., Madan J.R., Gujar K.N., Tupsamundre A., Ranpise H.A., Dua K. Formulation and evaluation of niosomal in situ nasal gel of a serotonin receptor agonist, buspirone hydrochloride for the brain delivery via intranasal route. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2018;6(1):69–78. DOI: 10.2174/2211738506666180130105919.
26. Sherje A.P., Londhe V. Development and evaluation of pH-responsive cyclodextrin-based in situ gel of paliperidone for intranasal delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(1):384–394. DOI: 10.1208/s12249-017-0844-8.
27. Chen Y., Liu Y., Xie J., Zheng Q., Yue P., Chen L., Hu P., Yang M. Nose-to-brain delivery by nanosuspensions-based in situ gel for breviscapine. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:10435–10451. DOI: 10.2147/IJN.S265659.
28. Akilo O.D., Kumar P., Choonara Y.E., du Toit L.C., Pradeep P., Modi G., Pillay V. In situ thermo-co-electroresponsive mucogel for controlled release of bioactive agent. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:255–270. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.044.
29. Qian Sh., Wong Y. Ch., Zuo Zh. Development, characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;468(1–2):272–282. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.04.015.
30. Salatin S., Barar J., Barzegar-Jalali M., Adibkia Kh., Jelvehgari M. Thermosensitive in situ nanocomposite of rivastigmine hydrogen tartrate as an intranasal delivery system: Development, characterization, ex vivo permeation and cellular studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;159:629–638. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.031.
31. Patil R.P., Pawara D.D., Gudewar Ch. S., Tekade A.R. Nanostructured cubosomes in an in situ nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(3):264–273. DOI: 10.1080/08982104.2018.1552703.
32. Lee B.H., West B., McLemore R., Pauken Ch., Vernon B.L. In-situ injectable physically and chemically gelling NIPAAm-based copolymer system for embolization. *Biomacromolecules*. 2006;7(6):2059–2064. DOI: 10.1021/bm060211h.
33. Lee B.H., Vernon B. In situ-gelling, erodible N-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecular Bioscience*. 2005;5(7):629–635. DOI: 10.1002/mabi.200500029.
34. Lee B.H., Beart H.H., Cheng V., McLemore R., Robb S.A., Cui Zh., Dovigi A., Vernon B.L. In vitro and in vivo demonstration of physically and chemically in situ gelling NIPAAm-based copolymer system. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2013;24(13):1575–1588. DOI: 10.1080/09205063.2013.781939.
35. Li Chen., Li Chun., Liu Zh., Li Q., Yan X., Liu Y., Lu W. Enhancement in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal in situ hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;474(1–2):123–133. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.023.
36. Pandey P., Pandey S., Cabot P.J., Wallwork B., Panizza B.J., Parekh H.S. Toxicity evaluation and nasal mucosal tissue deposition of dexamethasone-infused mucoadhesive in situ nasal gelling systems. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(7):914–919. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.06.005.
37. Ahmad N., Ahmad R., Ahmad F.J., Ahmad W., Alam M.A., Amir M., Ali A. Poloxamer-chitosan-based Naringenin nanoformulation used in brain targeting for the treatment of cerebral ischemia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(1):500–517. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.11.008.
38. Zakir F., Ahmad A., Farooq U., Mirza M.A., Tripathi A., Singh D., Shakeel F., Mohapatra S., Ahmad F.J., Kohli K. Design and development of a commercially viable in situ nanoemulgel for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nanomedicine*. 2020;15(12):1167–1187. DOI: 10.2217/nnm-2020-0079.
39. Kharenko E.A., Larionova N.I., Demina N.B. Mucoadhesive drug delivery systems. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2009;43(4):21–29. (In Russ.)
40. Bakhrushina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastopchina O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020; 8(A):639–645. DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
41. Paul A., Fathima K.M., Nair S.C. Intra nasal in situ gelling system of lamotrigine using ion activated mucoadhesive polymer. *The Open Medicinal Chemistry Journal*. 2017;11(1):222–244. DOI: 10.2174/1874104501711010222.
42. Mahajan, H. S. Gattani S. In situ gels of Metoclopramide Hydrochloride for intranasal delivery: In vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic study in rabbits. *Drug Delivery*. 2010;17(1):19–27. DOI: 10.3109/10717540903447194.
43. Kulkarni J.A., Avachat A.M. Pharmacodynamic and pharmacokinetic investigation of cyclodextrin-mediated asenapine maleate in situ nasal gel for improved bioavailability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(2):234–245. DOI: 10.1080/03639045.2016.1236808.
44. Gholizadeh H., Cheng Sh., Pozzoli M., Messerotti E., Traini D., Young P., Kourmatzis A., Ong H. X. Smart thermosensitive chitosan hydrogel for nasal delivery of ibuprofen to treat neurological disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019;16(4):453–466. DOI: 10.1080/17425247.2019.1597051.
45. Uppuluri Ch. T., Ravi P.R., Dalvi A.V., Shaikh Sh. Sh., Kale S.R. Piribedil loaded thermo-responsive nasal in situ gelling system for enhanced delivery to the brain: formulation optimization, physical characterization, and in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021;11(3):909–926. DOI: 10.1007/s13346-020-00800-w.
46. Le Guellec S., Ehrmann S., Vecellio L. In vitro – in vivo correlation of intranasal drug deposition. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;170:340–352. DOI: 10.1016/j.addr.2020.09.002.
47. Keustermans W., Huysmans T., Danckaers F., Zarowski A., Schmelzer B., Sijbers J., Dirckx J.J.J. High quality statistical shape modelling of the human nasal cavity and applications. *Royal Society Open Science*. 2018;5(12):181558. DOI: 10.1098/rsos.181558.
48. Möller W., Celik G., Feng Sh., Bartenstein P., Meyer G., Eickelberg O., Schmid O., Tatkov S. Nasal high flow clears anatomical dead space in upper airway models. *Journal of Applied Physiology*. 2015;118(12):1525–1532. DOI: 10.1152/jappphysiol.00934.2014.
49. Liu Y., Johnson M.R., Matida E.A., Kherani S., Marsan J. Creation of a standardized geometry of the human nasal cavity. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(3):784–795. DOI: 10.1152/jappphysiol.90376.2008.
50. Corey J.P., Gungor A., Nelson R., Fredberg J., Lai V. A Comparison of the nasal cross-sectional areas and volumes obtained with acoustic rhinometry and magnetic resonance imaging. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1997;117(4):349–354. DOI: 10.1016/S0194-5998(97)70125-6.
51. Cheng K.-H., Cheng Y.-S., Yeh H.-Ch., Guilmette R. A., Simpson S. Q., Yang Y.-H., Swift D. L. In vivo measurements of nasal airway dimensions and ultrafine aerosol deposition in the human nasal and oral airways. *Journal of Aerosol Science*. 1996;27(5):785–801. DOI: 10.1016/0021-8502(96)00029-8.
52. Calmet H., Inthavong K., Eguzkitza B., Lehmkuhl O., Houzeaux G., Vázquez M. Nasal sprayed particle deposition in a human nasal cavity under different inhalation conditions. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221330. DOI: 10.1371/journal.pone.0221330.
53. Chen J.Z., Kiaee M., Martin A.R., Finlay W.H. In vitro assessment of an idealized nose for nasal spray testing: Comparison with regional deposition in realistic nasal replicas. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;582:119341. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119341.
54. Kundoor V., Dalby R. N. Assessment of nasal spray deposition pattern in a silicone human nose model using a color-based method. *Pharmaceutical Research*. 2010;27(1):30–36. DOI: 10.1007/s11095-009-0002-4.
55. Warnken Z. N., Smyth H. D. C., Davis D. A., Weitman S., Kuhn J. G., Williams R. O. Personalized medicine in nasal delivery: The use of patient-specific administration parameters to improve nasal drug targeting using 3D-printed nasal replica casts. *Molecular Pharmaceutics*. 2018;15(4):1392–1402. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00702.

Крупнейшая в Сибири международная выставка
оборудования, сырья и услуг для производства
фармацевтических препаратов и форум для
специалистов фармацевтической отрасли.

ТЕХНО ФАРМ С И Б И Р Ь

17-18 марта 2022 г.

**NOVOSIBIRSK
EXPO CENTRE**

Организатор: ООО ТехноФарм www.techno-farm.com

 @tehnopharm_sib
expo@techno-farm.com

+ 7-913-891-39-39
(по вопросам участия)

+ 7-913-003-77-75
(по вопросам рекламных и
спонсорских возможностей)

+ 7-961-216-99-51
(регистрация посетителей)



Для бесплатного посещения выставки, пожалуйста, заполните форму на сайте.

Ждём Вас на выставке!

www.technopharm-siberia.com

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-65-71>
УДК 615.326:549.67



Оригинальная статья / Research article

Исследование физико-химических характеристик цеолитов Холинского месторождения

А. В. Бондарев^{1*}, Е. Т. Жиликова¹, Н. Б. Демина², К. К. Размахнин³

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

² ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), кафедра фармацевтической и биомедицинской технологии, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ Читинский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института горного дела им. Н. А. Чинакала Сибирского отделения Российской академии наук (ЧФ ИГД СО РАН), 672039, Россия, г. Чита, ул. Александрово-Заводская, д. 30

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

ORCID: А. В. Бондарев – <https://orcid.org/0000-0003-0077-7031>; Е. Т. Жиликова – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>; Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; К. К. Размахнин – <https://orcid.org/0000-0003-2944-7642>.

Статья поступила: 13.04.2021

Статья принята в печать: 28.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Минеральная сырьевая база России располагает эффективными сорбционными веществами, которые соответствуют фармацевтическим требованиям. Перспективным минеральным сырьем являются цеолиты, сочетающие в себе свойства адсорбента и «молекулярного сита» за счет пористой структуры. Помимо энтеросорбционного направления, природные цеолиты являются источником макро- и микроэлементов, что обуславливает их применение в качестве биологически активных пищевых добавок.

Цель. Исследование физико-химических характеристик цеолитов Холинского месторождения.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали цеолитное минеральное сырье Холинского месторождения. Оптическую микроскопию осуществляли на прямом микроскопе Leica DM (Microsystems, Германия). Энергодисперсионный анализ проводили при помощи электронного сканирующего микроскопа JSM-5300 (JEOL, Ltd., Япония). Исследование сорбционных характеристик проводили на приборе ASAP 2400 (Micromeritics, США). Построение виртуальной трехмерной молекулярной модели цеолита проводили при помощи программы Java Applet Jmol.

Результаты и обсуждение. Исследованы физико-химические свойства цеолитов. Установлено, что морфологически частицы цеолитовой фазы имеют размер 5–30 мкм, они равномерно распределены по всей площади участка и представляют первый структурный уровень. Частицы цеолитовой фазы размером 5–6 мкм формируют второй структурный уровень за счет кристаллов клиноптилолита, микротрещин и микрожеод. На основании энергодисперсионного спектрального анализа выявлено повышенное содержание элементов К и Na, что указывает на щелочной состав катионного обменного комплекса. Исследуемые образцы цеолита имеют микропоры (объем 0,0031 см³/г), мезопоры (объем 0,0675 см³/г), удельная поверхность составила 29,1840 м²/г. Разработана виртуальная трехмерная молекулярная модель цеолита Холинского месторождения. Согласно молекулярной модели сорбционные характеристики цеолита Холинского месторождения составили: удельная поверхность – 1096,31 м²/г (1916,34 м²/см³), средний диаметр сферической молекулы для адсорбции в порах равен 5,97 Å.

Заключение. Анализ сорбционных характеристик цеолита позволил выявить следующие его особенности: поры занимают половину объема всего цеолита, которые доступны для сорбции воды и низкомолекулярных веществ. Каждая пора по трем взаимно перпендикулярным направлениям сообщается с соседними через «окна». Образуется система внутрикристаллических пор и полостей, в которых может происходить адсорбция молекул соответствующего размера.

Ключевые слова: лекарственное минеральное сырье, цеолит, клиноптилолит, сорбент, молекулярная модель

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

Вклад авторов. А. В. Бондарев и Е. Т. Жиликова придумали и разработали алгоритм эксперимента по изучению цеолитов и участвовали в написании текста статьи. А. В. Бондарев и К. К. Размахнин проводили микроскопию образцов и исследование их сорбционных характеристик. А. В. Бондарев и Н. Б. Демина участвовали в обработке данных. А. В. Бондарев проводил теоретические расчеты, разрабатывал виртуальную трехмерную молекулярную модель цеолита Холинского месторождения. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Читинскому филиалу Института горного дела им. Н. А. Чинакала СО РАН за предоставленные образцы цеолитов Холинского месторождения. Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

Для цитирования: Бондарев А. В., Жиликова Е. Т., Демина Н. Б., Размахнин К. К. Исследование физико-химических характеристик цеолитов Холинского месторождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4):65–71. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-65-71>

Investigation of the Physical and Chemical Characteristics of the Zeolites of the Kholinsky Deposit

Alexander V. Bondarev^{1*}, Elena T. Zhilyakova¹, Natalya B. Demina², Konstantin K. Razmakhnin³

© Бондарев А. В., Жиликова Е. Т., Демина Н. Б., Размахнин К. К., 2021

© Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Razmakhnin K. K., 2021

¹ Belgorod National Research University, Department of Pharmaceutical Technology, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Department of Pharmaceutical and Biomedical Technology, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

³ Chita Division of Chinalak Institute of Mining of the Siberian Branch of the RAS, 30, Alexandro-Zavodskaya str., Chita, 672039, Russia

*Corresponding author: Natalia B. Demina. E-mail: alexbond936@yandex.ru

ORCID: Alexander V. Bondarev – <https://orcid.org/0000-0003-0077-7031>; Elena T. Zhilyakova – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>;

Natalya B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Konstantin K. Razmakhnin – <https://orcid.org/0000-0003-2944-7642>.

Received: 13.04.2021

Revised: 28.09.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. The mineral resource base of Russia has effective sorption substances that meet pharmaceutical requirements. Promising mineral raw materials are Zeolites, which combine the properties of an adsorbent and a "molecular sieve" due to the porous structure. In addition to the enterosorption direction, natural Zeolites are a source of macro- and microelements, which determines their use as biologically active food additives.

Aim. Study of the physical and chemical characteristics of the Zeolites of the Kholinsky deposit.

Materials and methods. The zeolite mineral raw materials of the Kholinsky deposit were used as objects of research. Optical microscopy was performed using a Leica DM direct microscope (Microsystems, Germany). Energy dispersion analysis was performed using an electron scanning microscope JSM-5300 (Jeol Ltd, Japan). The sorption characteristics were studied using the ASAP 2400 device (Micromeritics, USA) according to the method. The construction of a virtual three-dimensional molecular model of the Zeolite was carried out using the program Java Applet Jmol.

Results and discussion. The physicochemical properties of Zeolites are investigated. It is established that morphologically the particles of the zeolite phase have a size of 5–30 microns, they are evenly distributed over the entire area of the site and represent the first structural level. Particles of the zeolite phase with a size of 5–6 microns form the second structural level due to Clinoptilolite crystals, microcracks and microgeodes. Based on the energy-dispersion spectral analysis, an increased content of the elements K, Na was revealed, which indicates the alkaline composition of the cation exchange complex. The studied Zeolite samples have micropores (volume 0.0031 cm³/g), mesopores (volume 0.0675 cm³/g), and a specific surface area of 29.1840 m²/g. A virtual three-dimensional molecular model of the Zeolite of the Kholinsky deposit has been developed. According to the molecular model, the sorption characteristics of the Kholinsky deposit Zeolite were: specific surface area – 1096.31 m²/g (1916.34 m²/cm³), the average diameter of the spherical molecule for adsorption in the pores is 5.97 Å.

Conclusion. The analysis of the sorption characteristics of the Zeolite revealed the following features: the pores occupy half the volume of the entire Zeolite, which are available for the sorption of water and low-molecular substances. Each pore in three mutually perpendicular directions communicates with the neighboring ones through "windows". A system of intracrystalline pores and cavities is formed, in which the occlusion and adsorption of molecules of the appropriate size easily occurs.

Keywords: medicinal mineral raw materials, Zeolite, Clinoptilolite, sorbent, molecular model

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

Contribution of the authors. Alexander V. Bondarev and Elena T. Zhilyakova came up with and developed an algorithm for an experiment to study Zeolites and participated in writing the text of the article. Alexander V. Bondarev and Konstantin K. Razmakhnin performed microscopy of samples and study of sorption characteristics. Alexander V. Bondarev and Natalya B. Demina participated in data processing. Alexander V. Bondarev carried out theoretical calculations, developed a virtual three-dimensional molecular model of the Zeolite of the Kholinsky deposit. All the authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors are grateful to the Chita Division of Chinalak Institute of Mining of the Siberian Branch of the RAS for the provided samples of zeolites from the Kholinsky deposit. This study did not receive any financial support from outside organizations.

For citation: Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Razmakhnin K. K. Investigation of the physical and chemical characteristics of the zeolites of the kholinsky deposit. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):65–71. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-65-71>

ВВЕДЕНИЕ

В процессе очистки и обогащения минерально-го сырья получают медицинские глины, которые можно применять в качестве активных фармацевтических субстанций для производства энтеросорбентов, в качестве вспомогательных веществ, а также активного компонента для вальверсорбции [1]. В настоящее время в России зарегистрирована одна фармацевтическая субстанция на основе медицинских глин – смектит диоктаэдрический [2]. Помимо смектитовой группы, минеральная сырьевая база России располагает эффективными сорбционными веществами, которые соответствуют фармацевтическим тре-

бованиям [3–5]. Перспективным минеральным сырьем являются цеолиты, сочетающие в себе свойства адсорбента и «молекулярного сита» за счет пористой структуры. Помимо энтеросорбционного направления, природные цеолиты являются источником макро- и микроэлементов, что обуславливает их применение в качестве биологически активных пищевых добавок [6–7].

Первым этапом изучения нового лекарственного минерального сырья является исследование его физико-химических характеристик, которые позволяют прогнозировать сорбционные характеристики сырья. Основными сорбционными характеристиками явля-

ются пористость и сорбционная активность [8–9]. Пористая структура сорбентов обеспечивает селективное извлечение молекул соответствующего объема. Сорбционная активность возрастает с увеличением удельной площади поверхности и уменьшении размеров пор сорбента. Цеолиты имеют преимущественно микропористую структуру, поэтому при адсорбции относительно небольших молекул объем микропор составляет основную часть адсорбционного объема пор цеолита [10–11]. Наряду с традиционными адсорбционными методами исследования пористой структуры сорбентов успешно развиваются методы, основанные на моделировании пористой структуры и анализа сорбционных характеристик при помощи современных компьютерных программ [12–13].

Цель исследования. Исследование физико-химических характеристик цеолитов Холинского месторождения.

Задачи исследования:

1. Исследовать физико-химические свойства цеолитов Холинского месторождения.
2. Разработать виртуальную трехмерную молекулярную модель цеолита Холинского месторождения.
3. Провести анализ сорбционных характеристик цеолитов Холинского месторождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали цеолитное минеральное сырье Холинского месторождения. Подготовка образцов включила измельчение в лабораторной мельнице МЛ-1 (ООО «ЛАБТЕХ», Россия) и просеивание для придания однородности через сито с диаметром пор 0,16 мкм.

Оптическую микроскопию осуществляли на прямом микроскопе Leica DM (Microsystems, Германия) с режимом темного поля (DF) согласно ГОСТ Р ИСО 27911-2015 «Государственная система обеспечения единства измерений. Химический анализ поверхности. Сканирующая зондовая микроскопия. Определение и калибровка латерального разрешения ближнепольного оптического микроскопа». Энергодисперсионный анализ проводили при помощи электронного сканирующего микроскопа JSM-5300 (JEOL, Ltd., Япония) согласно ГОСТ Р ИСО 22309-2015 «Государственная система обеспечения единства измерений. Микроанализ электронно-зондовый. Количественный анализ с использованием энергодисперсионной спектроскопии для элементов с атомным номером от 11 (Na) и выше». Исследование сорбционных характеристик проводили методом адсорбции азота при 77 К на приборе ASAP 2400 (Micromeritics, США) согласно методике [14].

Построение виртуальной трехмерной молекулярной модели цеолита Холинского месторождения проводили при помощи программы Java Applet Jmol. Для изучения размера, геометрии и связности пор клиноптилолита применили метод визуализации и

рендеринга виртуальных трехмерных молекулярных моделей цеолита в проекциях X, Y и Z. Уточнение проводилось исходя из предположения состава SiO_2 и межатомными расстояниями: $d_{\text{Si-O}} = 1,61 \text{ \AA}$; вес = 2,0; $d_{\text{O-O}} = 2,629 \text{ \AA}$; вес = 0,41; $d_{\text{Si-Si}} = 3,07 \text{ \AA}$; вес = 0,23. В каждом случае координаты сначала оптимизировались в пределах приблизительной элементарной ячейки, а затем уточнялся размер элементарной ячейки. Рассчитывался результирующий индекс надежности, показывающий, насколько хорошо предполагаемые геометрические параметры соответствуют структуре каркаса цеолита [15–16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании классификации лекарственного минерального сырья, разработанного на кафедре фармацевтической технологии НИУ «БелГУ», а также в соответствии с систематикой, утвержденной Международной минералогической ассоциацией, лекарственное минеральное сырье включает четыре группы, получившие свое название благодаря основополагающему минералу. По форме соединения структурных минеральных единиц сырье делится на подкласс филлосиликаты (слоистые или листовые силикаты), к которому относятся группы палыгорскита, смектита, каолинита и подкласс тектосиликаты (каркасные силикаты) из семейства цеолитов. Семейство состоит из 237 минералов, известных к настоящему времени. Цеолиты имеют открытую каркасную непрерывную структуру из кислородных тетраэдров с центральным атомом кремния или алюминия. Атомы кислорода связаны с двумя соседними тетраэдрами и образуют непрерывную кристаллическую структуру в виде пространственного каркаса. Цеолиты можно рассматривать как пространственный неорганический полимер, состоящий из алюмосиликатных тетраэдров. При замене четырехвалентного кремния в тетраэдре на трехвалентный алюминий происходит появление одной лишней валентности. Для компенсации отрицательного заряда тетраэдр образует связи с катионами щелочных металлов: калием, натрием, кальцием, магнием и другими. На следующем уровне строения тетраэдры цеолитов объединяются между собой в кольца по четыре, шесть, восемь и более тетраэдров. Объем пор в цеолитах превышает половину объема кристалла. Эффективный диаметр пор цеолитов составляет диапазон 0,26–0,8 нм [17]. Поры заполнены молекулами цеолитной воды. Максимальным поглотительным эффектом обладают высококремнистые цеолиты с большой величиной отношения кремния к алюминию. При увеличении этого соотношения возрастает пористость и увеличивается диаметр входных окон. Из трех видов пор цеолиты располагают только микропорами [18–19].

К цеолитам, имеющим в настоящее время наибольшую практическую сырьевую значимость, отно-

сится клиноптилолит [20]. В России наиболее крупным месторождением цеолитов является Холинское с преобладанием в сырье клиноптилолита. В пределах Холинского месторождения выявлены четыре пластообразные залежи цеолитизированных пород с пологим залеганием и крайне невыдержанными содержаниями цеолитов (10–60 %) и мощностями залежей (1–150 м). Прогнозные ресурсы месторождения с содержанием клиноптилолита более 50 % оценены в 650 млн т [21]. Формула цеолита Холинского месторождения имеет вид $\text{Na}_6(\text{AlO}_2)_6(\text{SiO}_2)_{30} \times 24\text{H}_2\text{O}$.

В таблице 1 представлен оксидный состав цеолитного минерального сырья Холинского месторождения ($P = 0,95$).

Согласно данным энергодисперсионной спектроскопии, установлено распределение Al, Si, O, Na, K, Ca, Fe по площади участка основной массы породы, выявлено повышенное содержание элементов алюмокремне-кислородного тетраэдра цеолитов: O, Al, Si. Высокое содержание K и Na указывает на щелочной состав катионного обменного комплекса. Исследуемые образцы содержат макроэлементы и микроэлементы: железо, магний, марганец, медь, молибден, никель, титан, ванадий, цинк. Содержание токсичных элементов свинца, кадмия, мышьяка и ртути не превышает максимально допустимый уровень, лимитируемый техническими условиями. Благодаря наличию катионного обмена комплекса клиноптилолит обладает сорбционными ионообменными свойствами. Катионы щелочных металлов могут легко замещаться катионами других металлов [22].

Состав и структура цеолитов определяет их сорбционные характеристики. Сорбционные характеристики цеолитного минерального сырья Холинского месторождения представлены в таблице 2 ($P = 0,95$).

Согласно представленным данным, исследуемые образцы клиноптилолита имеют микропоры (объем $0,0031 \text{ см}^3/\text{г}$), мезопоры (объем $0,0675 \text{ см}^3/\text{г}$), удельная поверхность составила $29,1840 \text{ м}^2/\text{г}$. Сорбционные характеристики свидетельствуют о высокой удельной поверхности сорбента и его полифункциональной сорбционной активности.

На рисунке 1 представлена микрофотография цеолитового минерального сырья Холинского месторождения, полученная на сканирующем электронном микроскопе в отраженных электронах.

Согласно анализу микрофотографии, сделан вывод о преобладании цеолитовой фазы. Частицы цеолитовой фазы имеют размер 5–30 мкм, они равномерно распределены по всей площади участка и представляют первый структурный уровень.

На рисунке 2 представлена микрофотография цеолитовой фазы, полученная на сканирующем электронном микроскопе в отраженных электронах.

На рисунке 2 различимы частицы цеолитовой фазы размером 5–6 мкм. Они формируют второй структурный уровень за счет кристаллов клиноптилолита,

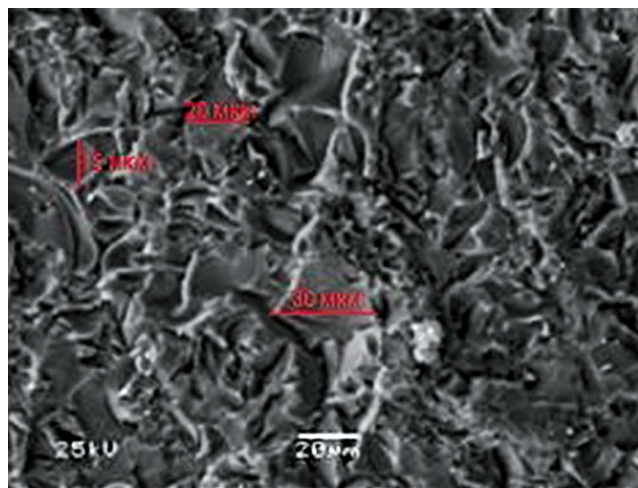


Рисунок 1. Микрофотография цеолитового минерального сырья Холинского месторождения

Figure 1. Micrograph of zeolite mineral raw materials of the Kholinsky deposit

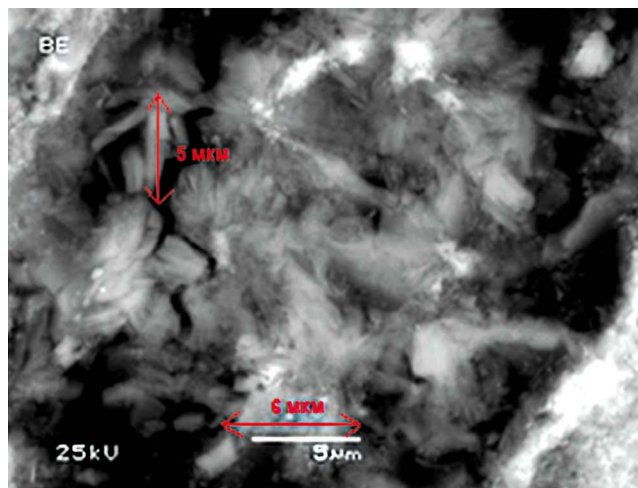


Рисунок 2. Микрофотография цеолитовой фазы

Figure 2. Micrograph of the zeolite phase

микротрещин и микрожеод. Микрожеод представляет собой образование в виде замкнутой полости в цеолитовой фазе.

Для изучения сорбционных характеристик возможно применение теоретических методов, основанных на компьютерном моделировании цеолитных систем с учетом квантово-химического взаимодействия частиц. Для изучения размера, геометрии и связности пор применили метод визуализации и рендеринга моделей цеолита в проекциях X, Y и Z, который позволил сформировать виртуальную трехмерную молекулярную модель цеолита Холинского месторождения, представленную на рисунке 3.

Согласно молекулярной модели сорбционные характеристики цеолита Холинского месторождения составили: удельная поверхность – $1096,31 \pm 0,02 \text{ м}^2/\text{г}$

Таблица 1. Оксидный состав цеолитного минерального сырья Холинского месторождения
Table 1. Oxide composition of zeolite mineral raw materials of the Kholinsky deposit

Оксид Oxide	SiO ₂	Al ₂ O ₃	K ₂ O	H ₂ O	CaO	Na ₂ O	Fe ₂ O ₃	MgO	MnO	TiO ₂	FeO	S	P ₂ O ₅	Примеси Impurities	Итого Total
Содержание, % Content, %	65,60 ± 0,16	12,23 ± 0,05	4,14 ± 0,01	3,82 ± 0,01	2,07 ± 0,13	1,90 ± 0,01	1,25 ± 0,05	0,64 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01	8,03 ± 0,05	100

Таблица 2. Сорбционные характеристики цеолитного минерального сырья Холинского месторождения
Table 2. Sorption characteristics of zeolite mineral raw materials of the Kholinsky deposit

Объем мезопор по N ₂ , см ³ /г The volume of mesopores according to N ₂ , cm ³ /g	0,0675 ± 0,0040
Пористость, % Porosity, %	40,8704 ± 0,8000
Эквивалентный радиус пор, Å Equivalent pore radius, Å	91,5158 ± 0,0004
Средний радиус пор (по поверхности), мкм Average pore radius (on the surface), microns	0,0026 ± 0,0005
Средний радиус пор (по объему), мкм Average pore radius (by volume), microns	0,3617 ± 0,0005
Поверхность микропор, м ² /г Micropore surface, m ² /g	6,2139 ± 0,6000
Удельная поверхность, м ² /г Specific surface area, m ² /g	29,1840 ± 0,8000
Объем микропор, см ³ /г Volume of micropores, cm ³ /g	0,0031 ± 0,0030
Суммарный объем пор по предельному насыщению N ₂ , см ³ /г Total pore volume by maximum saturation N ₂ , cm ³ /g	0,0677 ± 0,0040
Характеристика Characteristic	Показатель Indicator

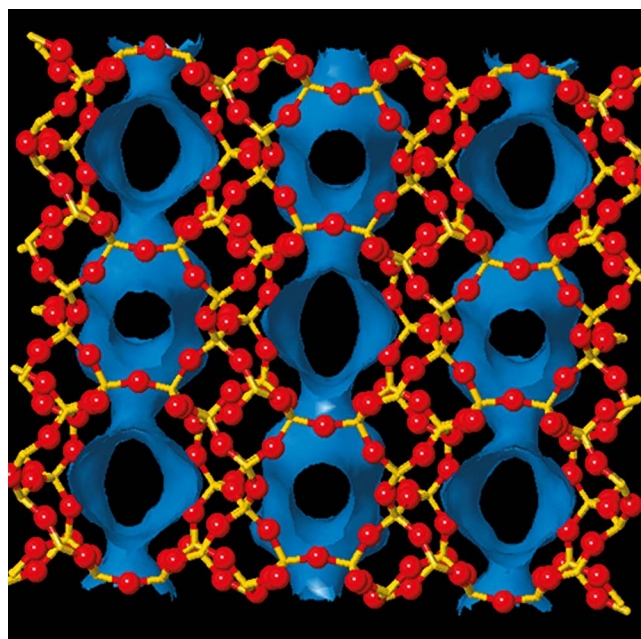


Рисунок 3. Виртуальная трехмерная молекулярная модель цеолита Холинского месторождения

Figure 3. Virtual three-dimensional molecular model of the zeolite of the Kholinsky deposit

(1916,34 ± 0,04 м²/см³), средний диаметр сферической молекулы для адсорбции в порах равен 5,97 Å.

Анализ сорбционных характеристик цеолита позволил выявить следующие его особенности: поры занимают половину объема всего цеолита, которые доступны для сорбции воды и низкомолекулярных веществ. Каждая пора по трем взаимно перпендикулярным направлениям сообщается с соседними через «окна». Образуется система внутрикристаллических пор и полостей, в которых легко происходит окклюзия и адсорбция молекул соответствующего размера. В данном случае методом моделирования удалось рассчитать полную удельную поверхность так называемого «идеального сорбента» без адсорбированных молекул. Поэтому полная удельная поверхность модели превысила показатель, полученный методом низкотемпературной сорбции азота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследованы физико-химические свойства цеолитов. Установлено, что морфологически частицы цеолитовой фазы имеют размер 5–30 мкм, они равномерно распределены по всей площади участка и представляют первый структурный уровень. Частицы цеолитовой фазы размером 5–6 мкм формируют второй структурный уровень за счет кристаллов клиноптилолита, микротрещин и микрожеод. На основании энергодисперсионного спектрального анализа выявлено повышенное содержание элементов алюмо-кремне-кислородного тетраэдра цеолитов: O, Al, Si. Высокое

содержание К и Na указывает на щелочной состав катионного обменного комплекса. Исследуемые образцы цеолита имеют микропоры (объем 0,0031 см³/г), мезопоры (объем 0,0675 см³/г), удельная поверхность составила 29,1840 м²/г. Сорбционные характеристики, полученные методом низкотемпературной сорбции азота, свидетельствуют о высокой удельной поверхности сорбента и его полифункциональной сорбционной активности.

2. Разработана виртуальная трехмерная молекулярная модель цеолита Холинского месторождения с помощью программного приложения Java Applet Jmol для построения кристаллических структур. Согласно молекулярной модели сорбционные характеристики цеолита Холинского месторождения составили: удельная поверхность – 1096,31 м²/г (1916,34 м²/см³), средний диаметр сферической молекулы для адсорбции в порах равен 5,97 Å.
3. Анализ сорбционных характеристик цеолита позволил выявить следующие его особенности: поры занимают половину объема всего цеолита, которые доступны для сорбции воды и низкомолекулярных веществ. Каждая пора по трем взаимно перпендикулярным направлениям сообщается с соседними через «окна». Образуется система внутрикристаллических пор и полостей, в которых легко происходит адсорбция молекул соответствующего размера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарев А. В., Жилиякова Е. Т., Демина Н. Б., Тимошенко Е. Ю. Перспективы использования медицинских глин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):27–31. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31.
2. Жилиякова Е. Т., Бондарев А. В. Обзор российских энтеросорбционных лекарственных средств. *Remedium*. 2014;10:40–47. DOI: 10.21518/1561-5936-2014-10-40-47.
3. Bondarev A., Zhilyakova E., Bondareva N., Fadeeva D. Classification and Systematics of Medical Clay. *Advances in Biological Sciences Research*. 2019;7:44–46. DOI: 10.2991/isils-19.2019.10.
4. Шапиев Б. И., Алиев А. А., Шапиева К. Б., Канбулатова З. Ш., Халиков А. С. Использование природных цеолитов Дагестана в медицине и ветеринарии. *Экологическая медицина*. 2018;1(1):87–92.
5. Голохваст К. С., Паничев А. М., Гульков А. Н. Использование цеолитов в медицине и ветеринарии. *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. 2008;3:71–75.
6. Белкин Б. Л., Кубасов В. А. Использование хотынецких природных цеолитов в ветеринарии и птицеводстве. *Вестник Орловского государственного аграрного университета*. 2011;6(33):35–38.
7. Rimoli M. G., Rabaioli M. R., Melisi D., Curcio A., Mondello S., Mirabelli R., Abignante E. Synthetic zeolites as a new tool for drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87A(1):156–164. DOI: 10.1002/jbm.a.31763.
8. McCusker L. B., Liebau F., Engelhardt G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. *Pure and Applied Chemistry*. 2001;73(2):381–394.
9. Sing K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemi-*

cal and Engineering Aspects. 2001;187–188:3–9. DOI: 10.1016/S0927-7757(01)00612-4.

10. Bacakova L., Vandrovcsa M., Kopova I., Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomater Sci*. 2018;6(5):974–989. DOI: 10.1039/c8bm00028j.
11. Паничев А. М., Кулаков Ю. В., Гульков А. Н. Применение цеолитов в медицине. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2003;4(14):21–24.
12. Rhodes C. J. Properties and applications of Zeolites. *Science Progress*. 2010;93(3):223–284. DOI: 10.3184/003685010X12800828155007.
13. Millini R. Application of modeling in zeolite science. *Catalysis Today*. 1998;41(1–3):41–51. DOI: 10.1016/S0920-5861(98)00037-6.
14. Вячеславов А. С., Померанцева Е. А., Гудилин Е. А. Измерение площади поверхности и пористости методом капиллярной конденсации азота. М.: МГУ; 2006. 60 с.
15. Бушуев Ю. Г. Цеолиты. Компьютерное моделирование цеолитных материалов. Иваново: Ивановский государственный химико-технологический университет; 2011. 104 с.
16. Database of Zeolite Structures. Available at: <http://www.iza-structure.org/databases>. Accessed: 05.03.2021.
17. Milina M., Mitchell S., Cooke D., Crivelli P., Pérez-Ramírez J. Impact of pore connectivity on the design of long-lived zeolite catalysts. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54(5):1591–1594. DOI: 10.1002/anie.201410016.
18. Эпова Е. С., Еремин О. В., Русаль О. С., Филенко Р. А. Процессы активации сорбционных свойств цеолитовых пород Шивиртуйского месторождения (Восточное Забайкалье). *Минералогия техногенеза*. 2015;16:148–154.
19. Perez-Ramírez J., Christensen C. H., Egeblad K., Christensen C. H., Groen J. C. Hierarchical zeolites: enhanced utilisation of microporous crystals in catalysis by advances in materials design. *Chem. Soc. Rev*. 2008;37(11):2530–2542.
20. Cutovic M., Lazovic M., Vukovic-Dejanovic V., Nikolic D., Petronic-Markovic I., Cirovic D. Clinoptilolite for treatment of dyslipidemia: preliminary efficacy study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2017;23(9):738–744. DOI: 10.1089/acsm.2016.0414.
21. Размахнин К. К. Характеристика вещественного состава и технологического-минералогические характеристики цеолитсодержащих туфов Восточного Забайкалья. *Горный информационно-аналитический бюллетень*. 2007;12:315–328.
22. Шерматов Б. Э., Мансурова М. С., Ялгаев Э. Я., Курбанов Э. Н., Исмаев Д. Н. Исследование физико-химических свойств и регенерации отработанных цеолитов. *Инновации в науке: научный журнал*. 2017;15(76):43–45.

REFERENCES

1. Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Timoshenko E. Yu. Prospects for the use of medical clays. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(4):27–31. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31.
2. Zhilyakova E. T., Bondarev A. V. Overview of russian enterosorbents. *Remedium*. 2014;10:40–47. (In Russ.) DOI: 10.21518/1561-5936-2014-10-40-47.
3. Bondarev A., Zhilyakova E., Bondareva N., Fadeeva D. Classification and Systematics of Medical Clay. *Advances in Biological Sciences Research*. 2019;7:44–46. DOI: 10.2991/isils-19.2019.10.
4. Shapiey B. I., Aliev A. A., Shapieva K. B., Kanbulatova Z. Sh., Khalikov A. S. Use of natural zeolites of Dagestan in medicine and veterinary medicine. *Ekologicheskaya meditsina*. 2018;1(1):87–92. (In Russ.)
5. Golokhvast K. S., Panichev A. M., Gulkov A. N. Application of natural zeolites in medicine and veterinary. *Vestnik Dal'nevostochnogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk = Vestnik of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences*. 2008;3:71–75. (In Russ.)
6. Belkin B. L., Kubasov V. A. *Ispolzovanie khotynetskikh prirodnnykh tseolotov v veterinarii i ptitsevodstve* [The use of Kholin natural zeolites in veterinary medicine and poultry farming]. *Vestnik Orlovsko-*

- go gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2011;6(33):35–38. (In Russ.)
7. Rimoli M. G., Rabaioli M. R., Melisi D., Curcio A., Mondello S., Mirabelli R., Abignente E. Synthetic zeolites as a new tool for drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87A(1):156–164. DOI: 10.1002/jbm.a.31763.
8. McCusker L. B., Liebau F., Engelhardt G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. *Pure and Applied Chemistry*. 2001;73(2):381–394.
9. Sing K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001;187–188:3–9. DOI: 10.1016/S0927-7757(01)00612-4.
10. Bacakova L., Vandrovcova M., Kopova I., Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomater Sci*. 2018;6(5):974–989. DOI: 10.1039/c8bm00028j.
11. Panichev A. M., Kulakov Yu. V., Gulkov A. N. Use of zeolites in medicine. *Pacific Medical Journal*. 2003;4(14):21–24. (In Russ.)
12. Rhodes C. J. Properties and applications of Zeolites. *Science Progress*. 2010;93(3):223–284. DOI: 10.3184/003685010X12800828155007.
13. Millini R. Application of modeling in zeolite science. *Catalysis Today*. 1998;41(1–3):41–51. DOI: 10.1016/S0920-5861(98)00037-6.
14. Vyacheslavov A. S., Pomerantseva E. A., Gudilin E. A. *Izmerenie ploshchadi poverkhnosti i poristosti metodom kapillyarnoy kondensatsii azota* [Measurement of surface area and porosity by capillary nitrogen condensation]. Moscow: MGU; 2006. 60 p. (In Russ.)
15. Bushuev Yu. G. *Tseolity. Komp'yuternoe modelirovanie tseolitnykh materialov*. [Zeolites. Computer modeling of zeolite materials]. Ivanovo: Ivanovskiy gosudarstvennyy khimiko-tekhnologicheskii universitet; 2011. 104 p. (In Russ.)
16. Database of Zeolite Structures. Available at: <http://www.iza-structure.org/databases>. Accessed: 05.03.2021.
17. Milina M., Mitchell S., Cooke D., Crivelli P., Pérez-Ramírez J. Impact of pore connectivity on the design of long-lived zeolite catalysts. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54(5):1591–1594. DOI: 10.1002/anie.201410016.
18. Epova E. S., Eremin O. V., Rusal' O. S., Filenko R. A. *Protsessy aktivatsii sorbtionnykh svoystv tseolitovykh porod Shivyrtuyskogo mestorozhdeniya (Vostochnoe zabaykal'e)* [Processes of activation of the sorption properties of zeolite rocks of the Shivyrtuisky field (Eastern Transbaikalia)]. *Mineralogiya tekhnogineza*. 2015;16:148–154. (In Russ.)
19. Perez-Ramírez J., Christensen C. H., Egeblad K., Christensen C. H., Groen J. C. Hierarchical zeolites: enhanced utilisation of microporous crystals in catalysis by advances in materials design. *Chem. Soc. Rev*. 2008;37(11):2530–2542.
20. Cutovic M., Lazovic M., Vukovic-Dejanovic V., Nikolic D., Petronic-Markovic I., Cirovic D. Clinoptilolite for treatment of dyslipidemia: preliminary efficacy study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2017;23(9):738–744. DOI: 10.1089/acm.2016.0414.
21. Razmakhnin K. K. *Kharakteristika veshchestvennogo sostava i tekhnologo-mineralogicheskie kharakteristiki tseolitsoderzhashchikh tufov Vostochnogo Zabaykal'ya* [Characteristics of the material composition and technological and mineralogical characteristics of zeolite-containing tufts of Eastern Transbaikalia]. *Gornyy informatsionno-analiticheskiy byulleten' = Mining informational and analytical bulletin*. 2007;12:315–328. (In Russ.)
22. Shermatov B. E., Mansurova M. S., Yalgashev E. Ya., Kurbanov E. N., Ismatov D. N. Investigation of physico-chemical properties and regeneration of waste zeolite. *Innovatsii v nauke: nauchnyy zhurnal*. 2017;15(76):43–45. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-72-80>
УДК 577.34 + 57.043 + 57.013



Оригинальная статья / Research article

Основы разработки микроволновой интенсификации upstream process на примере *Escherichia coli*

Д. Б. Кузнецов^{1*}, А. Ю. Миронов², В. А. Несчислаев¹, И. Л. Вольхин³, А. М. Королюк⁴,
Е. В. Орлова¹, А. Д. Шилина¹

¹ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА), 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (МНИИЭМ), 125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

³ ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), 614068, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (СПбГПМУ), 194100, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

* Контактное лицо: Кузнецов Денис Бахтиерович. E-mail: denis.pfa@gmail.com

ORCID: Д. Б. Кузнецов – <https://orcid.org/0000-0003-0884-848X>; А. Ю. Миронов – <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>; В. А. Несчислаев – <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>;

И. Л. Вольхин – <https://orcid.org/0000-0002-8564-0968>; А. М. Королюк – <https://orcid.org/0000-0002-4680-3322>; Е. В. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-5120-7058>;

А. Д. Шилина – <https://orcid.org/0000-0002-2420-445X>.

Статья поступила: 22.03.2021

Статья принята в печать: 22.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Штаммы *E. coli* являются основными микроорганизмами, используемыми для получения ряда важных биофармацевтических продуктов. На Земле не существует естественных источников микроволнового излучения, так как оно поглощается верхними слоями атмосферы. Важность исследования биологического действия СВЧ-излучения ни у кого не вызывает сомнений. С каждым годом растет число публикаций, посвященных данной проблеме, и появляются новые идеи использования микроволн в технологии получения лекарств.

Цель. Выявить основные эффекты СВЧ-облучения и разработать технологию микроволновой интенсификации роста культуры *E. coli*.

Материалы и методы. В настоящем исследовании представлены результаты атомно-силовой микроскопии, рефрактометрии, ЯМР-релаксометрии, турбидиметрии и люминометрии, демонстрирующие возможность микроволновой интенсификации процесса культивирования.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что СВЧ-облучение приводит к изменениям подвижности протонов и адсорбции молекул воды на биополимерах и клетках. Это является основными звеньями механизма «нетеплового» микроволнового воздействия. Однократное СВЧ-облучение в зависимости от ряда параметров может снижать или повышать прирост биомассы. Исследования биолюминесценции штамма *E. coli* с *lux*-опероном показали, что оптимальные условия обработки не оказывают негативного влияния на продукцию люциферазы и метаболическую активность клеток.

Заключение. Процедура интенсификации с использованием СВЧ-излучения может считаться перспективным методом и может дать новые идеи для различных приложений в биотехнологии.

Ключевые слова: *E. coli*, биолюминесценция, люцифераза, СВЧ-излучение, рост культуры

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

Вклад авторов. Д. Б. Кузнецов, В. А. Несчислаев, И. Л. Вольхин разработали концепцию, спланировали эксперимент, собрали установки, провели исследования и интерпретировали результаты. Е. В. Орлова принимала участие в написании текста статьи и интерпретации результатов. Д. Б. Кузнецов, А. Ю. Миронов, А. М. Королюк и А. Д. Шилина обработали результаты экспериментов и подготовили текст статьи к публикации.

Для цитирования: Кузнецов Д. Б., Миронов А. Ю., Несчислаев В. А., Вольхин И. Л., Королюк А. М., Орлова Е. В., Шилина А. Д. Основы разработки микроволновой интенсификации upstream process на примере *Escherichia coli*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4):72–80. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-72-80>

Basics of the Development of Microwave Intensification of Upstream on the Example of *Escherichia coli*

Denis B. Kuznetsov^{1*}, Andrey Yu. Mironov², Valery A. Neschislyayev¹, Igor L. Volkhin³,
Alexander M. Korolyuk⁴, Ekaterina V. Orlova¹, Anastasiya D. Shilina¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, Perm Territory, 614990, Russia

² Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. G. N. Gabrichevsky, 10, Admirala Makarova str., Moscow, 125212, Russia,

³ Perm State University, 15, Bukireva str., Perm, Perm Territory, 614068, Russia

⁴ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya str., St. Petersburg, 194100, Russia

*Corresponding author: Denis B. Kuznetsov. E-mail: denis.pfa@gmail.com

ORCID: Denis B. Kuznetsov – <https://orcid.org/0000-0003-0884-848X>; Andrey Yu. Mironov – <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

Valery A. Neschislyayev – <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>; Igor L. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-8564-0968>;

Alexander M. Korolyuk – <https://orcid.org/0000-0002-4680-3322>; Ekaterina V. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-5120-7058>;

Anastasiya D. Shilina – <https://orcid.org/0000-0002-2420-445X>.

Received: 22.03.2021

Revised: 22.09.2021

Published: 25.11.2021

© Кузнецов Д. Б., Миронов А. Ю., Несчислаев В. А., Вольхин И. Л., Королюк А. М., Орлова Е. В., Шилина А. Д., 2021

© Kuznetsov D. B., Mironov A. Yu., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Korolyuk A. M., Orlova E. V., Shilina A. D., 2021

Abstract

Introduction. *E. coli* strains are the main microorganisms used for the production of a number of important biopharmaceutical products. There are no natural sources of microwave radiation on Earth, as it is absorbed by the upper atmosphere. No one doubts the importance of studying the biological effect of microwave radiation. The number of publications devoted to this problem is growing every year, and new ideas for the use of microwaves in drug production technology are emerging.

Aim. Reveal the main effects of microwave irradiation and develop a technology for microwave intensification of *E. coli* culture growth.

Materials and methods. This study presents the results of atomic force microscopy, refractometry, NMR relaxometry, turbidimetry, and lumimetry, demonstrating the possibility of microwave intensification of the cultivation process.

Results and discussion. It was found that microwave irradiation leads to changes in the mobility of protons and the adsorption of water molecules on biopolymers and cells. These are the main links in the mechanism of "non-thermal" microwave action. A single microwave irradiation, depending on a number of parameters, can decrease or increase the growth of biomass. Studies of the bioluminescence of the *E. coli* strain with the *lux*-operon have shown that the optimal processing conditions do not negatively affect the luciferase production and metabolic activity of cells.

Conclusion. The intensification procedure using microwave radiation can be considered a promising method and can provide new ideas for various applications in biotechnology.

Keywords: *E. coli*, bioluminescence, luciferase, microwave radiation, culture growth

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

Contribution of the authors. Denis B. Kuznetsov, Valery A. Neschislyayev, Igor L. Volkhin developed a concept, planned an experiment, assembled installations, conducted research and interpreted the results. Ekaterina V. Orlova took part in writing the text of the article and interpreting the results. Denis B. Kuznetsov, Andrey Yu. Mironov, Alexander M. Korolyuk and Anastasiya D. Shilin processed the results of the experiments and prepared the text of the article for publication.

For citation: Kuznetsov D. B., Mironov A. Yu., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Korolyuk A. M., Orlova E. V., Shilina A. D. Basics of the development of microwave intensification of upstream on the example of *Escherichia coli*. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):72–80. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-72-80>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время клеточные линии млекопитающих, преимущественно линия клеток CHO (яичник китайского хомячка), являются основными платформами для производства терапевтических молекул из-за возможности получения гликозилированных полипептидов. Однако генно-инженерные штаммы кишечной палочки по-прежнему остаются основными продуцентами ряда важных терапевтических продуктов на основе гетерологичных белков [1–3].

Около 30 % всех одобренных терапевтических белков продуцируются именно в кишечной палочке [4–6].

За последнее десятилетие интерес к использованию микроволнового излучения в различных отраслях сильно повышался. Однако «нетепловое» микроволновое воздействие на бактериальные культуры изучено недостаточно. В ряде работ утверждается, что микроволновое излучение способно «избирательно» нагревать вещества в интересующей системе [7, 8].

Для исключения «теплового» эффекта температура в процессе микроволнового облучения должна контролироваться и быть в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$.

В большинстве случаев в работах не указываются такие основные параметры облучения, как поток мощности излучения и глубина проникновения поля (скин-слой), а также условия засева культуры. Все это значительно усложняет как воспроизводимость, так и интерпретацию результатов исследований.

Наши первые исследования с различными производственными штаммами лактобактерий продемонстрировали различие в приросте биомассы при СВЧ-облучении [9]. Ранее нами проведены работы с потенциально производственным штаммом *E. coli* LEGM-18, которые показали возможность управления накоплением биомассой, а также влияние радиационных и биологических факторов на воспроизводимость процесса культивирования и получение полезного биотехнологического эффекта [10]. Настоящее исследование направлено на достижение более глубокого понимания основных звеньев механизма повышения активности культуры кишечной палочки и разработку основ интенсификации процесса культивирования рекомбинантного штамма *E. coli* с использованием крайне высокочастотного излучения.

Штамм *E. coli* K12 является основным производственным штаммом и используется для получения продуцентов различных белков [11, 12].

Цельноклеточные биосенсоры чувствительны к факторам окружающей среды и могут реагировать на многие виды воздействий. Обычно их используют для определения интегральных параметров и состояний, таких как стресс, токсичность и т. д. В этой работе используется штамм *E. coli* K12 TG1 с *lux*-опероном, который зарекомендовал себя как надежный инструмент для определения интегрального влияния широкого спектра соединений различной природы и электромагнитного излучения (ЭМИ) на бактериальную клетку [13, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования

В эксперименте использован штамм *E. coli* K12 TG1 hsd R17 hsdM thi relA1 supE44 Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 с lux-опероном *PhotoRHA* *Abdus luminescens* ZM1) [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование метаболической активности

Изменение метаболической активности клеток определяли методом биолюминесцентного тестирования. Подготовка образца для исследования биолюминесценции включала регидратацию лиофилизированного штамма бактерий 0,9%-м раствором хлорида натрия, охлажденным до 6 ± 2 °C. После 30-минутной выдержки при температуре (6 ± 2) °C разбавленную суспензию индикаторного штамма достали из холодильника и оставили не менее 30 минут при 22 ± 2 °C. Затем суспензию разливали в полимерные пробирки объемом 1 мл и помещали в экспериментальную установку для СВЧ-облучения. Уровень люминесценции образцов биосенсора определяли при 22 ± 2 °C. Работа на установке «Биотокс-10М» (ООО «НЕРА-С», Россия) проводилась согласно инструкции по эксплуатации установки.

Для изучения влияния излучения на свечение биосенсора эффект воздействия выражали либо в виде значений показателя люминесценции в имп/сек, либо в виде коэффициента свечения (безразмерная величина). Коэффициент свечения:

$$K = \frac{I_1 - I_2}{I_1},$$

где I_1 и I_2 – интенсивности свечения индикаторного штамма без и после облучения соответственно [16].

Увеличение интенсивности свечения прямо пропорционально ингибирующему эффекту, а уменьшение прямо пропорционально стимулирующему эффекту.

Исследование силы адгезии

На атомно-силовом микроскопе NTEGRA Prima – НаноЛаборатория (ООО «НТ-МДТ», Россия) были измерены разности высоты кантилевера в момент контакта с образцом и его отрыва от образца и получены изображения поверхностей клеток. Сила адгезии на поверхности клеток биосенсора вычислена по формуле:

$$F_a = k \times \Delta Z,$$

где k – твердость кантилевера; Z – разность высоты кантилевера в момент контакта с образцом и его отрыва от образца.

Рефрактометрия

Рефрактометрия проводилась с помощью рефрактометра RM50 (Mettler Toledo, США) при температуре 23 ± 1 °C. Погрешность измерения показателя преломления $\pm 0,00002$ nD.

ЯМР-релаксометрия

Параметры ЯМР-релаксации определены с помощью прибора mq10 NMR Analyzer (Bruker, США) в 10 МГц диапазоне. В соответствии с требованиями к измерениям температура образцов в релаксометре должна составлять 40 °C, поэтому пробы термостатировали 30 мин.

Определение оптической плотности

Измерения оптической плотности проводили на приборе Densi-La-Meter II (АО «Эрба Рус», Россия) и КФК-3 (ОАО «ЗОМЗ», Россия). Перед каждым измерением суспензию клеток тщательно перемешивали круговыми движениями без образования пузырьков, после чего около ½ мин образец отстаивался для выхода остаточных пузырьков воздуха, которые могли исказить результат.

Экспериментальная установка

На рисунке 1, а представлена схема установки, используемой для исследований в крайне высокочастотном диапазоне. Путь антенно-волнового тракта состоит из Г4-156 генератора, рупорной антенны и линзы. Для контроля потока излучения на противоположной стороне размещалась антенна, которая была подключена к нановольтметру. Подробное описание установки приведено в [17]. Емкость с образцом облучалась потоком микроволнового излучения 0,4 мВт/см². Емкость находилась в сечении СВЧ-пучка половинной мощности. В процессе облучения контролировали температуру и pH. Изменение температуры образцов в процессе эксперимента не превышало 1 °C. После облучения образцы термостатировались на водяной бане при температуре 37 ± 1 °C (рисунок 1, б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение глубины проникновения СВЧ-излучения

При воздействии СВЧ-излучения на бактериальную культуру следует учитывать, что вода является основным компонентом живых организмов, поэтому изменение ее свойств, таких как поляризация молекул, перенос протонов и связанная вода в полимерах может иметь большое значение. При СВЧ-облучении часть энергии сохраняется, а другая часть выделяется в виде теплового движения частиц. В немагнитных жидкостях плотность запасаемой энергии пропорци-

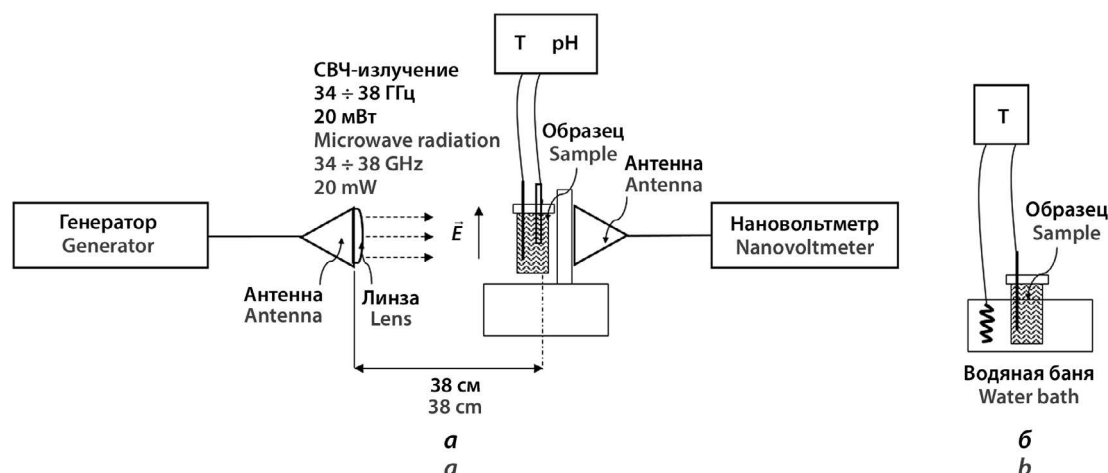


Рисунок 1. Экспериментальная установка:

a – установка на основе генератора Г4-156; **б** – водяная баня

Figure 1. Experimental setup:

a – setup based on the G4-156 generator; **b** – water bath

ональна диэлектрической проницаемости вещества, а выделяемая энергия пропорциональна коэффициенту диэлектрических потерь [18, 19]. При рассмотрении спектра поглощения жидкой воды наблюдается сильное поглощение излучения в диапазоне миллиметрового излучения [20]. Особое внимание следует обратить на показатели диэлектрической проницаемости и диэлектрических потерь в среде в этом диапазоне. Вероятно, для получения биологического эффекта необходимо относительное равенство между диэлектрической проницаемостью среды и диэлектрическими потерями [21].

СВЧ-облучение следует проводить при условии снижения интенсивности не более чем в 2,71 раза. Были проведены исследования для установления условий, при которых все клетки микроорганизмов находятся в поле СВЧ-излучения примерно одинаковой интенсивности. Для этого определялись толщина скин-слоя.

Электрическое сопротивление среды R_{cp} было определено для расчета поглощающей способности среды. Измерения проводились в течение 3,5 минут. Выявлено, что среда ГРМ-бульон (питательный бульон для культивирования микроорганизмов на основе гидролизата рыбной муки) имеет электрическое сопротивление $R_{cp} = 532 \pm 53$ Ом.

Для определения глубины проникновения микроволн в ГРМ-бульон использовались экспериментальные данные по электрическому сопротивлению и параметрам применяемых генераторов электромагнитного излучения. Удельная электропроводность рассчитана по формуле:

$$\sigma_{cp} = (c/ab R_{cp}),$$

где $a = 18$ мм, $b = 29$ мм, $c = 16$ мм – размеры слоя жидкости; R – электрическое сопротивление.

Толщина скин-слоя:

$$\delta = \sqrt{\frac{2}{2\pi f \mu_m \mu_0 \sigma_m}},$$

где f – частота микроволнового излучения, мкМ; μ_m – относительная магнитная проницаемость среды ($\mu_m = 1$); μ_0 – магнитная проницаемость вакуума ($4\pi \times 10^{-7}$ Гн/м). На рисунке 2, а показаны значения скин-слоя для различных частот СВЧ-излучения. Наибольшая глубина проникновения поля показана на частоте 37,04 ГГц.

Определение основных звеньев механизма СВЧ-облучения

При изучении влияния микроволнового излучения на бактериальную культуру *E. coli* исследование было разделено на несколько этапов:

1. Изучение влияния различных режимов СВЧ-облучения на свечение клеток.
2. Определение воздействия СВЧ-облучения на показатель преломления в питательной среде.
3. Исследование влияния СВЧ-облучения на параметры ЯМР-релаксометрии в питательной среде и культуре.
4. Получение данных атомно-силовой микроскопии и силы адгезии на поверхности клеток.

Биolumинесцентное тестирование

На первом этапе изучались влияние СВЧ-облучения на метаболическую активность методом люминесцентного тестирования. Знак минус указывает на повышение метаболической активности. Обнаруже-

но, что облучение миллиметровым СВЧ-излучением в течение одного часа сразу индуцирует люминесценцию биосенсора. Такая обработка обеспечивала стимуляцию свечения на протяжении всего эксперимента (рисунок 2, б, в). Установлена зависимость уровня люминесценции от частоты СВЧ-излучения и продолжительности облучения.

Рефрактометрия

На следующем этапе изучались эффекты воздействия СВЧ-излучения на показатель преломления и параметры ЯМР-релаксометрии. С учетом отсутствия изменения концентрации белков в стерильной питательной среде показатель преломления способен отражать изменения его конформационной структуры. Методом рефрактометрии установлено незначительное изменение показателя преломления (рисунок 2, г). Вероятно, наблюдаемый эффект связан с актом поглощения СВЧ-излучения молекулами-акцепторами, что приводит к смещению электронных плотностей и увеличению их поляризации. Повышение поляризации молекул растворителя в свою очередь изменяет электронные плотности в полипептиде, и прежняя конформация становится энергетически невыгодной, что приводит к разворачиванию спирали белков за счет встраивания молекул растворителя.

ЯМР-релаксометрия

Установлено, что влияние времени облучения питательной среды на количество малоподвижных протонов ^1H внутри надмолекулярных комплексов незначительно (рисунок 2, д). Однако количество протонов ^1H , участвующих в диполь-дипольном взаимодействии, увеличивается при облучении нелинейно и при 20 мин наблюдается насыщение (рисунок 2, е).

При добавлении в питательную среду клеток *E. coli* наблюдается повышение количества протонов ^1H внутри надмолекулярных комплексов, что обусловлено протонами ^1H , входящих в состав клеток, и образованием адсорбированной (связанной) воды. С увеличением продолжительности облучения наблюдается линейное незначительное их повышение, вероятно, обусловленное только за счет повышения количества адсорбированной воды. Также с увеличением продолжительности облучения наблюдается линейная зависимость увеличения протонов ^1H , участвующих в диполь-дипольном взаимодействии (рисунок 2, е).

Атомно-силовая микроскопия

При изучении влияния СВЧ-обработки проведено сканирование поверхностей клеток на атомно-силовом микроскопе. На рисунке 2, ж клетка без облучения, у клеток визуализируются ровные края. На рисунке 2, з клетки после облучения. На поверхностях клеток видна складчатая структура, а также уменьшение размера клетки. Складчатая структура обусловлена поверхностными полисахаридами с узкой

адсорбированной фазой. На рисунке 2, и видно, что сила адгезии значительно снижается с увеличением продолжительности облучения.

Полученные данные ЯМР-релаксометрии, АСМ и рефрактометрии подтверждают влияние СВЧ-излучения на подвижность протонов и обводненность биополимеров. Таким образом, установлено влияние нетеплового СВЧ-облучения на обводненность клеток посредством процесса «набухания» в питательной среде и синерезиса при ее удалении за счет изменения объема адсорбированной фазы молекул растворителя.

Проведенные исследования подтвердили влияние СВЧ-излучения на метаболическую активность и подвижность протонов, и обводненность биополимеров и клеток в среде посредством процесса синерезиса или «набухания» за счет изменения объема адсорбированной фазы молекул растворителя.

Ростовые характеристики культуры при микроволновом облучении

Исследование ростовых свойств культуры проводили на среде ГРМ-бульон. Установлено, что эффект значительно зависит от исходной концентрации, при которой проводится облучение и его продолжительность (рисунок 3). Обнаружено, что при концентрациях 60 млн кл/мл и 300 млн кл/мл микроволновое излучение значительно замедляет рост культуры, однако при облучении культуры с концентрацией 600 млн кл/мл не обнаружено изменение уровня статистически значимых различий. При концентрации 1200 млн кл/мл наблюдается прирост биомассы до 25 % только при 20-минутном облучении.

Зависимость эффекта прироста биомассы от концентрации также была продемонстрирована в работе [10]. Явление обусловлено тем, что концентрация бактериальных клеток определяет суммарные площади гидрофильных поверхностей, на которых происходит перераспределение зарядов и образование градиента концентрации протонов $\Delta\mu\text{H}^+$.

Люминесцентное тестирование *E. coli* после культивирования

В качестве исследования, демонстрирующего влияние микроволнового облучения на продукцию рекомбинантных белков, продуцируемых в клетках хозяина и их метаболическую активность, проведено люминесцентное тестирование после 24-часового культивирования в среде МПБ через 30 и 60 мин после разведения в 50 раз. Обнаружено, что облучение в течение 20 мин культуры с исходной концентрацией 1200 млн кл/мл приводит к выраженному повышению люминесценции (рисунок 4) по сравнению с образцами бактериальных культур, где концентрация была ниже (60, 300, 600 млн кл/мл). Таким образом, подтверждено отсутствие негативного влияния как на клетки хозяина, так и на продукцию рекомбинантных белков после СВЧ-облучения культуры и последующего культивирования.

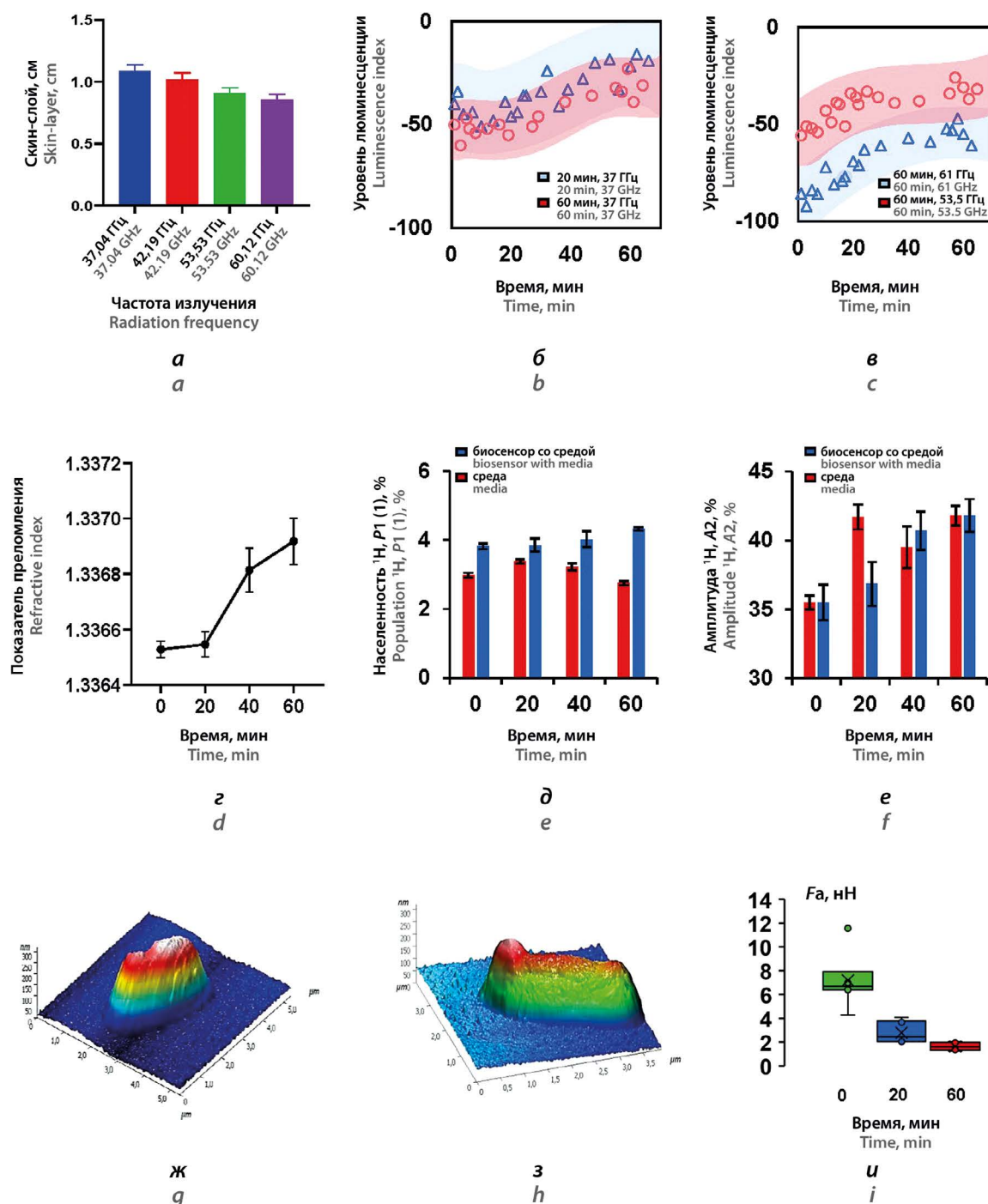


Рисунок 2. Эффекты микроволнового облучения:

а – глубина проникновения поля (скин-слой); **б** и **в** – уровень люминесценции биосенсора; **г** – показатель преломления питательной среды в зависимости от продолжительности облучения; **д** – населенность протонов ^1H , P1(1); **е** – амплитуда ^1H , A2; **ж** – клетка без облучения; **з** – клетка после облучения, 60 мин; **и** – сила адгезии на поверхности клеток в зависимости от продолжительности облучения

Figure 2. Effects of microwave irradiation:

а – the depth of field penetration (skin layer); **б** and **в** – the level of luminescence of the biosensor; **г** – the refractive index of the nutrient medium depending on the duration of irradiation; **д** – the population of protons ^1H , P1(1); **е** – the amplitude ^1H , A2; **ж** – cell without irradiation; **з** – cell after irradiation, 60 min; **и** – strength of adhesion on the cell surface depending on the duration of irradiation

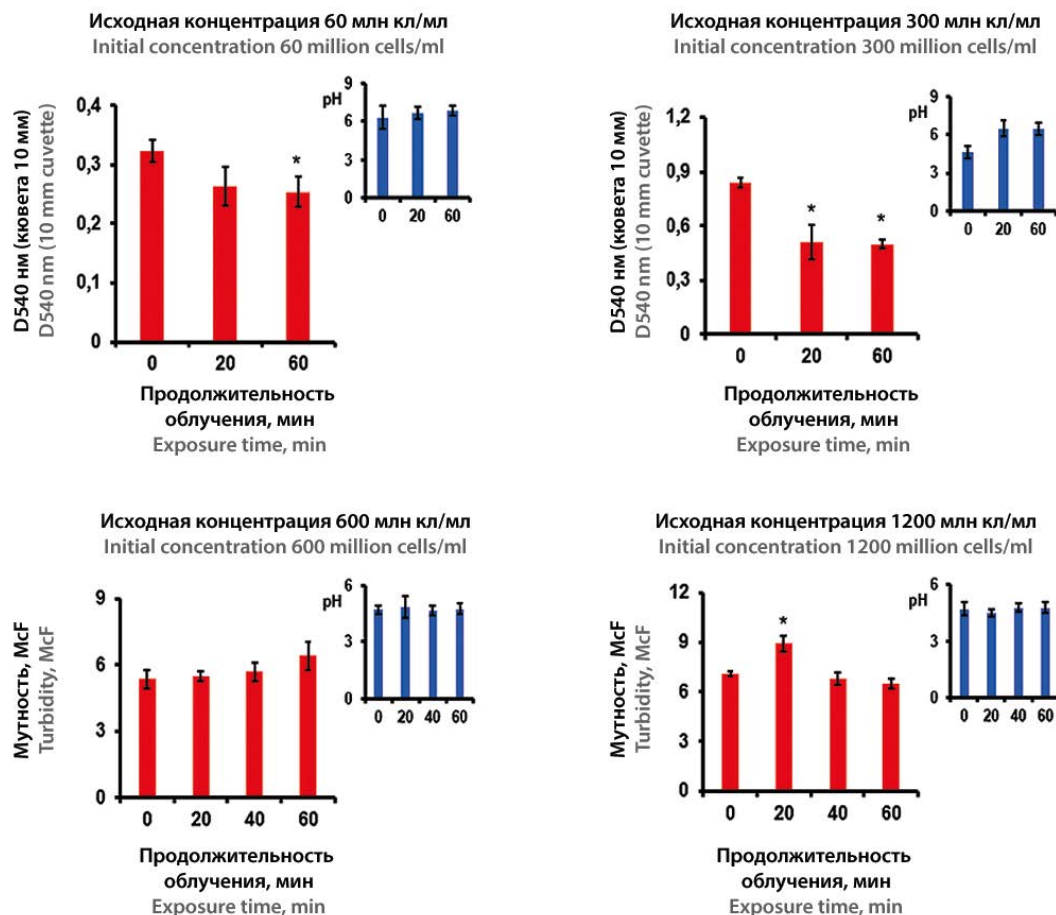


Рисунок 3. Влияние микроволнового облучения на ростовые характеристики культуры *E. coli*. * $p < 0,01$

Figure 3. Influence of microwave irradiation on the growth characteristics of *E. coli* culture. * $p < 0.01$

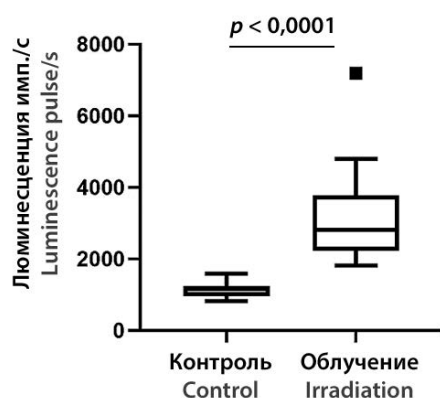


Рисунок 4. Люминесценция *E. coli*

Figure 4. Luminescence of *E. coli*

В связи с тем, что СВЧ-излучение в значительной степени поглощается водой, при определенных условиях оно может влиять на подвижность протонов и приводить к их перераспределению в системе «среда-клетка». Для обсуждения возможного механизма влияния «нетеплового» микроволнового облучения

на метаболическую активность и рост клеток рассмотрены известные механизмы свечения микроорганизмов с *lux*-оперонами. Во всех трех механизмах донорами протонов служат молекулы воды [22–25]. Кроме того, существует вероятность того, что неидентифицированным основанием могут выступать продукты диссоциации молекул воды.

В результате проведенных экспериментов установлено, что найденные параметры СВЧ-обработки приводят к запуску двух взаимосвязанных процессов: повышению концентрации малоподвижных протонов внутри надмолекулярных структур (расширение адсорбированной фазы воды) и увеличению фракции подвижных протонов, участвующих в межмолекулярном взаимодействии. Градиент концентрации протонов $\Delta\mu\text{H}^+$ является основным источником энергии любой клетки. Именно транспорт протонов через АТФ-синтазу обеспечивает синтез молекул АТФ. На основании выше полученных результатов предполагается, что микроволновая индукция процессов транспорта протонов влияет на градиент их концентрации в межмембранных пространствах. Совокупность этих процессов определяет эффект прироста биомассы при СВЧ-обработке.

В свою очередь, это может объяснить как излучение, которое в основном поглощается молекулами воды, может влиять на интенсивность люминесценции, прирост биомассы и продолжительность эффекта. Данные, представленные в данной работе, значительно расширяют представления о микроволновом воздействии на культуры микроорганизмов и позволят в перспективе разработать новые технологии с другими рекомбинатными микроорганизмами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был обнаружен ряд эффектов «нетеплового» микроволнового облучения. Показано, что наблюдаемые эффекты напрямую связаны с поглощением излучения молекулами-акцепторами. Определены параметры СВЧ-облучения, позволяющие повысить уровень люминесценции биосенсора и прирост биомассы. Таким образом, использование СВЧ-облучения для интенсификации роста кишечной палочки можно считать перспективным методом. Установлено, что ключевую роль в получении эффектов от «нетеплового» микроволнового облучения играют изменения подвижности протонов и процессов обводненности биополимеров и клеток посредством процесса синерезиса и «набухания» за счет изменения объема адсорбированной фазы. Это является основными звеньями механизма нетеплового СВЧ-воздействия и может дать новые идеи для его практического применения в технологии получения лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

- Agbogbo F. K., Ramsey P., George R., Joy J., Srivastava S., Huang M., McCool J. Upstream development of *Escherichia coli* fermentation process with PhoA promoter using design of experiments (DoE). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2020;47(9–10):789–799. DOI: 10.1007/s10295-020-02302-7.
- Bayer B., Stosch M., Striedner G., Duerkop M. Comparison of Modeling Methods for DoE-Based Holistic Upstream Process Characterization. *Biotechnology Journal*. 2020;15(5):1900551. DOI: 10.1002/biot.201900551.
- Kante R. K., Vemula S., Somavarapu S., Mallu M. R., Boje Gowd B. H., Ronda S. R. Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. *Biologicals*. 2018;56:45–53. DOI: 10.1016/j.biologicals.2018.10.002.
- Overton T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014;19(5):590–601. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.11.008.
- Sanchez-Garcia L., Martín L., Mangues R., Ferrer-Miralles N., Vázquez E., Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1):33. DOI: 10.1186/s12934-016-0437-3.
- Ehgartner D., Sagmeister P., Langemann T., Meitz A., Lubitz W., Herwig C. A novel method to recover inclusion body protein from recombinant *E. coli* fed-batch processes based on phage ΦX174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(14):5603–5614. DOI: 10.1007/s00253-017-8281-x.
- Dudley G. B., Richert R., Stieglman A. E. On the existence of and mechanism for microwave-specific reaction rate enhancement. *Chemical Science*. 2015;6(4):2144–2152. DOI: 10.1039/C4SC03372H.
- Kabb C. P., Carmean R. N., Sumerlin B. S. Probing the surface-localized hyperthermia of gold nanoparticles in a microwave field using polymeric thermometers. *Chemical Science*. 2015;6(10):5662–5669. DOI: 10.1039/C5SC01535A.
- Кузнецов Д. Б., Орлова Е. В., Несчисляев В. А., Вольхин И. Л., Широких А. А., Баландина А. В. Перспективный метод оптимизации производства пробиотических препаратов. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):16–19.
- Kuznetsov D., Volkhin I., Orlova E., Neschislyayev V., Balandina A., Shirokikh A. Microwave Radiation Effects on the Process of *Escherichia coli* Cultivation. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2019;47(3):372–380. DOI: 10.4014/mbi.1810.10024.
- Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*. 2013;12(1):58. DOI: 10.1186/1475-2859-12-58.
- Kelpšas V., von Wachenfeldt C. Strain improvement of *Escherichia coli* K-12 for recombinant production of deuterated proteins. *Scientific Reports*. 2019;9(1):17694. DOI: 10.1038/s41598-019-54196-w.
- Khudyakova A. V., Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Estimation of the Toxicity of a Metal/Carbon Nanocomposite of Copper by Biotesting. *Biology Bulletin*. 2019;46(10):1359–1363. DOI: 10.1134/S1062359019100145.
- Zarubina A. P., Gapochka M. G., Novoselova L. A., Gapochka L. D. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the "Ecolum" test-system. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2013;68(1):49–52. DOI: 10.3103/S0096392512030108.
- Данилов В. С., Зарубина А. П., Ерошников Г. Е., Соловьева Л. Н., Каташев Ф. В., Завильгельский Г. Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2002;3:20–24.
- Несчисляев В. А., Пшеничных Р. А., Арчакова Е. Г., Чистохина Л. П., Фадеева И. В. Способ определения антагонистической активности пробиотиков. Патент РФ на изобретение RU 2187801. 20.08.2002. Доступно по: https://i.moscow/patents/RU2187801C2_20020820. Ссылка активна на 23.07.2021.
- Kuznetsov D. B., Orlova E. V., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Izmetiev I. V., Lunegov I. V., Balandina A. V., Dianova D. G. Epitaxy of the bound water phase on hydrophilic surfaces of biopolymers as key mechanism of microwave radiation effects on living objects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;154:40–47. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.014.
- Stenishchev I. V., Basharin A. A. Toroidal response in all-dielectric metamaterials based on water. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9468. DOI: 10.1038/s41598-017-07399-y.
- Bordonsky G. S., Orlov A. O., Schegrina K. A. Dielectric Losses in Supercooled Pore Water at a Frequency of 34 GHz. *Radiophysics and Quantum Electronics*. 2017;59(10):812–820. DOI: 10.1007/s11141-017-9750-x.
- Carlson S., Brünig F. N., Locher P., Bonthuis D. J., Netz R. R. Exploring the Absorption Spectrum of Simulated Water from MHz to Infrared. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2020;124(27):5599–5605. DOI: 10.1021/acs.jpca.0c04063.
- Andryieuskiy A., Kuznetsova S. M., Zhukovsky S. V., Kivshar Yu. S., Lavrinenko A. V. Water: Promising Opportunities For Tunable All-dielectric Electromagnetic Metamaterials. *Scientific Reports*. 2015;5(1):13535. DOI: 10.1038/srep13535.
- Hartmann S., Hultschig C., Eisenreich W., Fuchs G., Bacher A., Ghisla S. NIH shift in flavin-dependent monooxygenation: Mechanistic studies with 2-aminobenzoyl-CoA monooxygenase/reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(14):7831–7836. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7831.
- Romero E., Gómez Castellanos J. R., Gadda G., Fraaije M. W., Mattevi A. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chemical Reviews*. 2018;118(4):1742–1769. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00650.
- Tinikul R., Chaiken P. Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – Volume 3*. New York City: Springer; 2014. P. 47–74. DOI: 10.1007/10_2014_281.

25. Campbell Z. T., Weichsel A., Montfort W. R., Baldwin T. O. Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the β Subunit. *Biochemistry*. 2009;48(26):6085–6094. DOI: 10.1021/bi900003t.

REFERENCES

1. Agbogbo F. K., Ramsey P., George R., Joy J., Srivastava S., Huang M., McCool J. Upstream development of *Escherichia coli* fermentation process with PhoA promoter using design of experiments (DoE). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2020;47(9–10):789–799. DOI: 10.1007/s10295-020-02302-7.
2. Bayer B., Stosch M., Striedner G., Duerkop M. Comparison of Modeling Methods for DoE-Based Holistic Upstream Process Characterization. *Biotechnology Journal*. 2020;15(5):1900551. DOI: 10.1002/biot.201900551.
3. Kante R. K., Vemula S., Somavarapu S., Mallu M. R., Boje Gowd B. H., Ronda S. R. Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. *Biologicals*. 2018;56:45–53. DOI: 10.1016/j.biologicals.2018.10.002.
4. Overton T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014;19(5):590–601. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.11.008.
5. Sanchez-Garcia L., Martín L., Mangues R., Ferrer-Mirallès N., Vázquez E., Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1):33. DOI: 10.1186/s12934-016-0437-3.
6. Ehgartner D., Sagmeister P., Langemann T., Meitz A., Lubitz W., Herwig C. A novel method to recover inclusion body protein from recombinant *E. coli* fed-batch processes based on phage Φ X174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(14):5603–5614. DOI: 10.1007/s00253-017-8281-x.
7. Dudley G. B., Richert R., Stiegman A. E. On the existence of and mechanism for microwave-specific reaction rate enhancement. *Chemical Science*. 2015;6(4):2144–2152. DOI: 10.1039/C4SC03372H.
8. Kabb C. P., Carmean R. N., Sumerlin B. S. Probing the surface-localized hyperthermia of gold nanoparticles in a microwave field using polymeric thermometers. *Chemical Science*. 2015;6(10):5662–5669. DOI: 10.1039/C5SC01535A.
9. Kuznetsov D. B., Orlova E. V., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Shirokih A. A., Balandina A. V. Promising method of production optimization probiotic preparations. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):16–19. (In Russ.)
10. Kuznetsov D., Volkhin I., Orlova E., Neschislyayev V., Balandina A., Shirokih A. Microwave Radiation Effects on the Process of *Escherichia coli* Cultivation. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2019;47(3):372–380. DOI: 10.4014/mbl.1810.10024.
11. Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*. 2013;12(1):58. DOI: 10.1186/1475-2859-12-58.
12. Kelpšas V., von Wachenfeldt C. Strain improvement of *Escherichia coli* K-12 for recombinant production of deuterated proteins. *Scientific Reports*. 2019;9(1):17694. DOI: 10.1038/s41598-019-54196-w.
13. Khudyakova A. V., Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Estimation of the Toxicity of a Metal/Carbon Nanocomposite of Copper by Biotesting. *Biology Bulletin*. 2019;46(10):1359–1363. DOI: 10.1134/S1062359019100145.
14. Zarubina A. P., Gapochka M. G., Novoselova L. A., Gapochka L. D. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the "Ecolum" test-system. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2013;68(1):49–52. DOI: 10.3103/S0096392512030108.
15. Danilov V. S., Zarubina A. P., Eroshnikov G. E., Solov'eva L. N., Katshev F. V., Zavil'gel'skiy G. B. *Sensornye bioluminescentnyye sistemy na osnove lux-operonov raznykh vidov luminescentnykh bakterij* [Sensory bioluminescent systems based on lux-operons of different types of luminescent bacteria]. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya = Moscow University Bulletin. Series 16. Biology*. 2002;3:20–24. (In Russ.)
16. Neschislyayev V. A., Pshenichnov R. A., Archakova E. G., Chistokhina L. P., Fadeeva I. V. *Sposob opredeleniya antagonisticheskoy aktivnosti probiotikov* [Method for determining the antagonistic activity of probiotics]. Patent RUS RU 2187801. 20.08.2002. Available at: https://i.moscow/patents/RU2187801C2_20020820. Accessed: 23.07.2021. (In Russ.)
17. Kuznetsov D. B., Orlova E. V., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Izmeshtiev I. V., Lunegov I. V., Balandina A. V., Dianova D. G. Epitaxy of the bound water phase on hydrophilic surfaces of biopolymers as key mechanism of microwave radiation effects on living objects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;154:40–47. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.014.
18. Stenishchev I. V., Basharin A. A. Toroidal response in all-dielectric metamaterials based on water. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9468. DOI: 10.1038/s41598-017-07399-y.
19. Bordonsky G. S., Orlov A. O., Schegrina K. A. Dielectric Losses in Supercooled Pore Water at a Frequency of 34 GHz. *Radiophysics and Quantum Electronics*. 2017;59(10):812–820. DOI: 10.1007/s11141-017-9750-x.
20. Carlson S., Brünig F. N., Locher P., Bonthuis D. J., Netz R. R. Exploring the Absorption Spectrum of Simulated Water from MHz to Infrared. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2020;124(27):5599–5605. DOI: 10.1021/acs.jpca.0c04063.
21. Andryeuskii A., Kuznetsova S. M., Zhukovsky S. V., Kivshar Yu. S., Lavrinenko A. V. Water: Promising Opportunities For Tunable All-dielectric Electromagnetic Metamaterials. *Scientific Reports*. 2015;5(1):13535. DOI: 10.1038/srep13535.
22. Hartmann S., Hultschig C., Eisenreich W., Fuchs G., Bacher A., Ghisla S. NIH shift in flavin-dependent monooxygenation: Mechanistic studies with 2-aminobenzoyl-CoA monooxygenase/reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(14):7831–7836. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7831.
23. Romero E., Gómez Castellanos J. R., Gadda G., Fraaije M. W., Mattevi A. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chemical Reviews*. 2018;118(4):1742–1769. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00650.
24. Tinikul R., Chaiyen P. Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – Volume 3*. New York City: Springer; 2014. P. 47–74. DOI: 10.1007/10_2014_281.
25. Campbell Z. T., Weichsel A., Montfort W. R., Baldwin T. O. Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the β Subunit. *Biochemistry*. 2009;48(26):6085–6094. DOI: 10.1021/bi900003t.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-81-88>
УДК 615.014



Оригинальная статья / Research article

Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в составе конъюгата полимерных частиц с белковой векторной молекулой

М. Б. Сокол^{1,2*}, Н. Г. Яббаров^{1,2}, М. Р. Моллаева^{1,2}, М. В. Чиркина (Фомичева)^{1,2},
В. Ю. Балабаньян³, Е. Д. Никольская^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), 119334, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

² ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО «ВНЦМДЛ»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

*Контактное лицо: Сокол Мария Борисовна. E-mail: mariyabsokol@gmail.com

ORCID: М. Б. Сокол – <https://orcid.org/0000-0002-1976-1972>; Н. Г. Яббаров – <https://orcid.org/0000-0003-3361-9136>; М. Р. Моллаева – <https://orcid.org/0000-0002-9999-4652>;

М. В. Чиркина (Фомичева) – <https://orcid.org/0000-0001-6061-4803>; В. Ю. Балабаньян – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>;

Е. Д. Никольская – <https://orcid.org/0000-0002-1931-3117>.

Статья поступила: 29.06.2021

Статья принята в печать: 30.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Применение противоопухолевого препарата паклитаксела ограничено из-за его высокой системной токсичности и липофильности, существенно лимитирующей создание парентеральных форм на основе субстанции паклитаксела. Предложена новая полимерная композиция паклитаксела, обеспечивающая направленный транспорт препарата в опухолевые клетки и повышающая профиль его безопасности.

Цель. Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в виде конъюгата частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с третьим доменом альфа-фетопротейна.

Материалы и методы. Объектом данного исследования являются наночастицы, содержащие паклитаксел, на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, поверхность которых модифицирована векторной молекулой – рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротейна. Наночастицы получали методами одинарного эмульгирования и преципитацией. Последующую конъюгацию с белковой молекулой проводили карбодиимидным методом. Анализ полученных наночастиц проводили с помощью динамического и электрофоретического светорассеяния, высокоэффективной жидкостной хроматографии, метода диализной мембраны.

Результаты и обсуждение. Разработан метод получения наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с паклитакселом, оптимизирована конъюгация полученных наночастиц с белковой векторной молекулой при варьировании широкого диапазона условий. Полученные наночастицы обладали средним диаметром 280 ± 12 нм. Эффективность конъюгации составила 95 %. Высвобождение паклитаксела из полимерной матрицы в среде 0,01 М фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) составило 65 % за 220 ч.

Заключение. Предложен метод получения и приведено обоснование состава оригинальной наноразмерной формы паклитаксела на основе конъюгата частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с третьим доменом альфа-фетопротейна. Показана возможность пролонгированного высвобождения паклитаксела из полимерной матрицы.

Ключевые слова: наночастицы, PLGA, паклитаксел, контролируемое высвобождение, альфа-фетопротейн

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

Вклад авторов. М. Б. Сокол, М. Р. Моллаева, Е. Д. Никольская и В. Ю. Балабаньян разрабатывали дизайн исследования, получение и анализ данных. Н. Г. Яббаров и М. В. Чиркина (Фомичева) проводили обзор публикаций. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и подготовке рукописи.

Для цитирования: Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Чиркина (Фомичева) М. В., Балабаньян В. Ю., Никольская Е. Д. Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в составе конъюгата полимерных частиц с белковой векторной молекулой. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):81–88. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-81-88>

Development of the Composition and Technology for Obtaining Paclitaxel Nanoscale Formulation Consisting of a Conjugate of Polymer Particles with a Protein Vector Molecule

Maria B. Sokol^{1,2*}, Nikita G. Yabbarov^{1,2}, Mariia R. Mollaeva^{1,2}, Margarita V. Chirkina (Fomicheva)^{1,2},
Vadim Yu. Balaban'yan³, Elena D. Nikolskaya^{1,2}

¹ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS (IBCP RAS), 4, Kosygina str., Moscow, 119334, Russia

² JSC "RCMDT", 8, Simferopol'skiy Boulevard, Moscow, 117638, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Maria B. Sokol. E-mail: mariyabsokol@gmail.com

ORCID: Maria B. Sokol – <https://orcid.org/0000-0002-1976-1972>; Nikita G. Yabbarov – <https://orcid.org/0000-0003-3361-9136>; Mariia R. Mollaeva – <https://orcid.org/0000-0002-9999-4652>;

Margarita V. Chirkina (Fomicheva) – <https://orcid.org/0000-0001-6061-4803>; Vadim Yu. Balaban'yan – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>;

Elena D. Nikolskaya – <https://orcid.org/0000-0002-1931-3117>.

Received: 29.06.2021

Revised: 30.09.2021

Published: 25.11.2021

© Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Чиркина (Фомичева) М. В., Балабаньян В. Ю., Никольская Е. Д., 2021

© Sokol M. B., Yabbarov N. G., Mollaeva M. R., Chirkina (Fomicheva) M. V., Balaban'yan V. Yu., Nikolskaya E. D., 2021

Abstract

Introduction. The use of the anticancer drug paclitaxel is limited due to its high toxicity and lipophilicity. A new polymer composition of paclitaxel has been proposed, which provides targeted transport of the drug into tumor cells and improves its safety.

Aim. Method development for preparation of a novel paclitaxel formulation consisting of a conjugate of PLGA nanoparticles with the third domain of alpha-fetoprotein.

Materials and methods. The object of this study is paclitaxel-loaded nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids, the surface of which is modified with a vector molecule – the recombinant third domain of alpha-fetoprotein. Nanoparticles were obtained by single emulsification method and precipitation. Conjugation with a protein molecule was performed by the carbodiimide method. The analysis of the obtained nanoparticles was carried out using dynamic and electrophoretic light scattering, high performance liquid chromatography, dialysis membrane method.

Results and discussion. Synthesis of paclitaxel-loaded nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids and its conjugation optimization under varying a wide range of conditions have been carried out. The resulting conjugate had an average diameter of 280 ± 12 nm. The conjugation efficiency was 95 %. The release of paclitaxel from the polymer matrix in the release medium was 65 % in 220 h.

Conclusions. A method of obtaining and substantiating the composition of the original nanosized form of paclitaxel is proposed. The possibility of prolonged release of paclitaxel from the polymer matrix has been shown.

Keywords: nanoparticles, PLGA, paclitaxel, controlled release, alpha-fetoprotein

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

Contribution of the authors. Maria B. Sokol, Mariia R. Mollaeva, Elena D. Nikolskaya and Vadim Yu. Balaban'yan carried out the study design, data acquisition and analysis. Nikita G. Yabbarov and Margarita V. Chirkina (Fomicheva) reviewed publications. All authors took part in the discussion of the results and preparation of the manuscript.

For citation: Sokol M. B., Yabbarov N. G., Mollaeva M. R., Chirkina (Fomicheva) M. V., Balaban'yan V. Yu., Nikolskaya E. D. Development of the composition and technology for obtaining paclitaxel nanoscale formulation consisting of a conjugate of polymer particles with a protein vector molecule. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):81–88. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-81-88>

ВВЕДЕНИЕ

Паклитаксел (Ptx) является химиотерапевтическим агентом, применяемым для лечения немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака молочной железы [1, 2]. Практическое использование Ptx затруднено из-за его высокой липофильности, в связи с чем в состав лекарственной формы Ptx для клинического применения входит солюбилизатор – Cremophor® EL. Использование последнего сопряжено с развитием реакций гиперчувствительности и возникновением нейтропении [2].

Вторая вышедшая на фармацевтический рынок лекарственная форма паклитаксела – Abraxane®. Этот препарат представляет собой наноразмерные агрегаты альбумина с нековалентно связанным Ptx [3]. Клинические исследования Abraxane® показали, что отсутствие Cremophor® EL снижает токсичность препарата и позволяет вводить дозу выше на 49 % без премедикации кортикостероидами [4]. В случае применения Abraxane® доставка Ptx в опухолевые ткани неспецифична и осуществляется за счет пассивного транспорта частиц альбумина, обусловленного эффектом повышенной проницаемости и удерживания [5].

В настоящее время сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) широко применяется для получения систем доставки лекарственных веществ. PLGA является биосовместимым и биodeградируемым полимером, одобренным регуляторными органами США

и Европы для парентерального применения [6]. Получение адресных систем доставки на основе PLGA с векторными молекулами является перспективной стратегией увеличения специфического действия лекарственных препаратов. В последние десятилетия широко изучается, в том числе и в нашей лаборатории [7], возможность использования рекомбинантного альфа-фетопротейна (AFP) и его функциональных фрагментов в качестве векторной молекулы для адресной доставки противоопухолевых препаратов. AFP является известным онкомаркером, экспрессия которого избирательно повышена в опухолевых клетках и практически отсутствует у нормальных клеток [8].

Ранее в нашей лаборатории была показана возможность получения наночастиц PLGA с паклитакселом и дальнейшей модификации их поверхности рекомбинантным третьим доменом AFP человека (rAFP3d) [9, 10]. В проведенном исследовании конъюгат адресного действия получали, образуя ковалентную связь между аминокислотными группами белка и карбоксильными группами модифицированного ангидридом янтарной кислоты поливинилового спирта (PVA), входящего в состав лиофилизата полученных наночастиц. Несмотря на доказанную клеточную интернализацию, уровень эндоцитоза разработанной системы и селективной доставки в клетки-мишени *in vivo* могут быть ограничены из-за десорбции модифицированного PVA с поверхности наночастиц [11].

В настоящей работе предложен и оптимизирован карбодиимидный метод [12] получения конъюгата адресного действия с помощью модификации карбоксильных групп PLGA, находящихся на поверхности наночастиц. Таким образом, удалось достичь постоянного количества связанного с наночастицами белка в полученной адресной системе доставки паклитаксела. Была доказана противоопухолевая эффективность и селективность действия полученного конъюгата, что подтверждает эффективность разработанной и оптимизированной технологии [13].

Цель исследования – разработка состава и технологии получения наноразмерной формы Ptx в виде конъюгата частиц PLGA с третьим доменом альфа-фетопротейна (rAFP3d-NP).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение наночастиц

Оптимизацию процесса получения наночастиц PLGA, нагруженных паклитакселом (NPs), проводили, анализируя такие параметры, как размер, дзета-потенциал, общее содержание (DL) и индекс полидисперсности (PDI) и варьируя метод получения наночастиц, тип используемого сополимера PLGA, соотношение PLGA:Ptx, соотношение объема органической и водной фаз (O:W), концентрацию стабилизатора эмульсии (PVA) и органический растворитель.

NPs получали методом одинарного эмульгирования или преципитации, как описано в опубликованных ранее работах авторов [14, 15]. Первичную эмульсию получали путем эмульгирования органической фазы, представляющей собой раствор паклитаксела (LC Laboratories, США) и PLGA (Purasorb®, D,L-лактид/гликолид = 50:50 моль/моль, характеристическая вязкость 0,2 и 0,4 см³/г, молекулярная масса 17–21 кДа; Corbion Biomedicals, Нидерланды) в органическом растворителе [дихлорметане (DCM), трихлорметане (TCM), смеси трихлорметан/ацетон (TCM/ACTN) с соотношением объемов 7:3; х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия], с водным раствором (0,5, 1 или 2 %) поливинилового спирта (степень гидролиза 87–90 %, Sigma-Aldrich, США) при помощи УЗ-гомогенизатора (Labsonic U.B. Braun, Германия). Для получения NPs использовали соотношения PLGA:Ptx, составляющие 1:5 или 1:10; соотношение O:W составляло 1:3, 1:5, 1:10 или 1:20. Органический растворитель удаляли под вакуумом, полученную наносuspension центрифугировали при +4 °C и 16 000 g в течение 30 мин. Ресуспандированный в 10 мл дистиллированной воды осадок фильтровали через стеклянный фильтр, замораживали с добавлением D-маннитола (10 масс. %, Sigma-Aldrich, США) в качестве криопротектора и лиофилизировали в течение 24 ч (Alpha 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия). Образцы хранили в холодильнике без доступа света при температуре +4 °C.

Размер полученных наночастиц и дзета-потенциал определяли методами динамического и электрофоретического рассеяния света, соответственно, на

приборе Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 instrument (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Общее содержание паклитаксела в наночастицах определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как было описано ранее [16].

Получение rAFP3d-NP

Конъюгат оптимизированных NPs с rAFP3d был получен с помощью карбодиимидного метода [13]. Расчет мольной концентрации PLGA проводили, исходя из концентрации карбоксильных групп 6 мг KOH/г, указанной в спецификации. Согласно [12], значение mEq/g = μmol/mg, что позволяет определить количество карбоксильных групп в навеске NPs (n) по формуле:

$$n = m(\text{NPs}) \times w(\text{PLGA}) \times \text{IA} \times M(\text{KOH})^{-1} \times 100^{-1},$$

где m(NPs) – масса навески наночастиц, мг; w(PLGA) – массовая доля PLGA в навеске частиц, %; IA – кислотное число, мг KOH/г; M(KOH) – молярная масса эквивалента KOH, г/моль.

20 мг предварительно отмытых NPs ресуспандировали в 1 мл 0,01 М PBS и инкубировали с 1,5 мкмоль (7,5 мкмоль, 15 мкмоль или 30 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC, Fluka, Германия) и 1,5 мкмоль (7,5 мкмоль, 15 мкмоль или 30 мкмоль) N-гидроксисукцинимидом (NHS, Merck, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 1,5 мкмоль (7,5 мкмоль, 15 мкмоль или 30 мкмоль) 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США) и перемешивали в течение 10 мин. В реакционную смесь добавляли растворы 0,15 мкмоль (0,30 мкмоль, 0,45 мкмоль, 0,75 мкмоль, 1,5 мкмоль или 7,5 мкмоль) rAFP3d в 0,01 М PBS (pH 7,4) и доводили pH раствора до 8,5 с помощью 10 М NaOH (Merck, Германия). rAFP3d был получен ранее в лаборатории ОАО «ВНЦМДЛ» [17]. После 30 мин инкубирования к полученной реакционной смеси добавляли 1,5 мкмоль этаноламина (Fluka, Германия) для остановки реакции, и перемешивали реакционную смесь еще 10 мин. Очистку и выделение целевого продукта реакции – rAFP3d-NP проводили с помощью гель-фильтрации на сорбенте Superose 12 (GE Healthcare, США), элюируя 0,1 М NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich, США). Для лиофилизации очищенной целевой фракции rAFP3d-NP подбирали тип и концентрацию криопротектора, добавляя сахарозу, глюкозу или D-маннитол (5 или 10 масс. %; х.ч. ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Образцы лиофилизировали в течение 24 ч (Alpha 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) и хранили при +4 °C.

Эффективность конъюгации (ЭК) определяли по формуле:

$$\text{ЭК} = (m_i/m_f) \times 100 \%,$$

где m_i – внесенная в реакционную смесь масса rAFP3d, мг; m_f – конечная масса rAFP3d в лиофилизированном продукте (конъюгат rAFP3d-NP), мг.

Исследование кинетики высвобождения паклитаксела

Для изучения скорости высвобождения паклитаксела из rAFP3d-NP использовали метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану. Около 10 мг rAFP3d-NP (точная навеска) наносили на мембрану (регенерированная целлюлоза, MWCO 10 кДа), неподвижно закрепленную в чаше для диализа Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Devices (Thermo Fisher Scientific, США). Чашу с навеской опускали на 2–3 мм в стакан с диализной средой (0,01 М PBS, pH 7,4) объемом 1,7 л. Температура инкубации составила 37 °С, что соответствует температуре кровяного русла человека. Через определенные промежутки времени отбирали пробу диализата и сразу же восполняли свежей средой до первоначального объема. Количественное содержание паклитаксела в диализате определяли с помощью ВЭЖХ [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода получения и обоснование состава наночастиц

С целью оптимизации процесса получения наночастиц оценивали влияние различных технологических параметров на размер, PDI, дзета-потенциал и DL паклитаксела в частицах (рисунки 1, 2).

Для получения частиц были выбраны стандартные методы инкапсулирования гидрофобных веществ – нанопреципитация и прямое эмульгирование [18].

Для получения наночастиц был выбран биodeградируемый и биосовместимый сополимер D,L-молочной и гликолевой кислот (PLGA). С целью дальнейшей функционализации поверхности наночастиц оптимизацию процесса получения проводили с использованием полимеров с терминальной карбоксильной группой. Ранее нами было показано, что использование полимера с соотношением лактидных и гликолид-

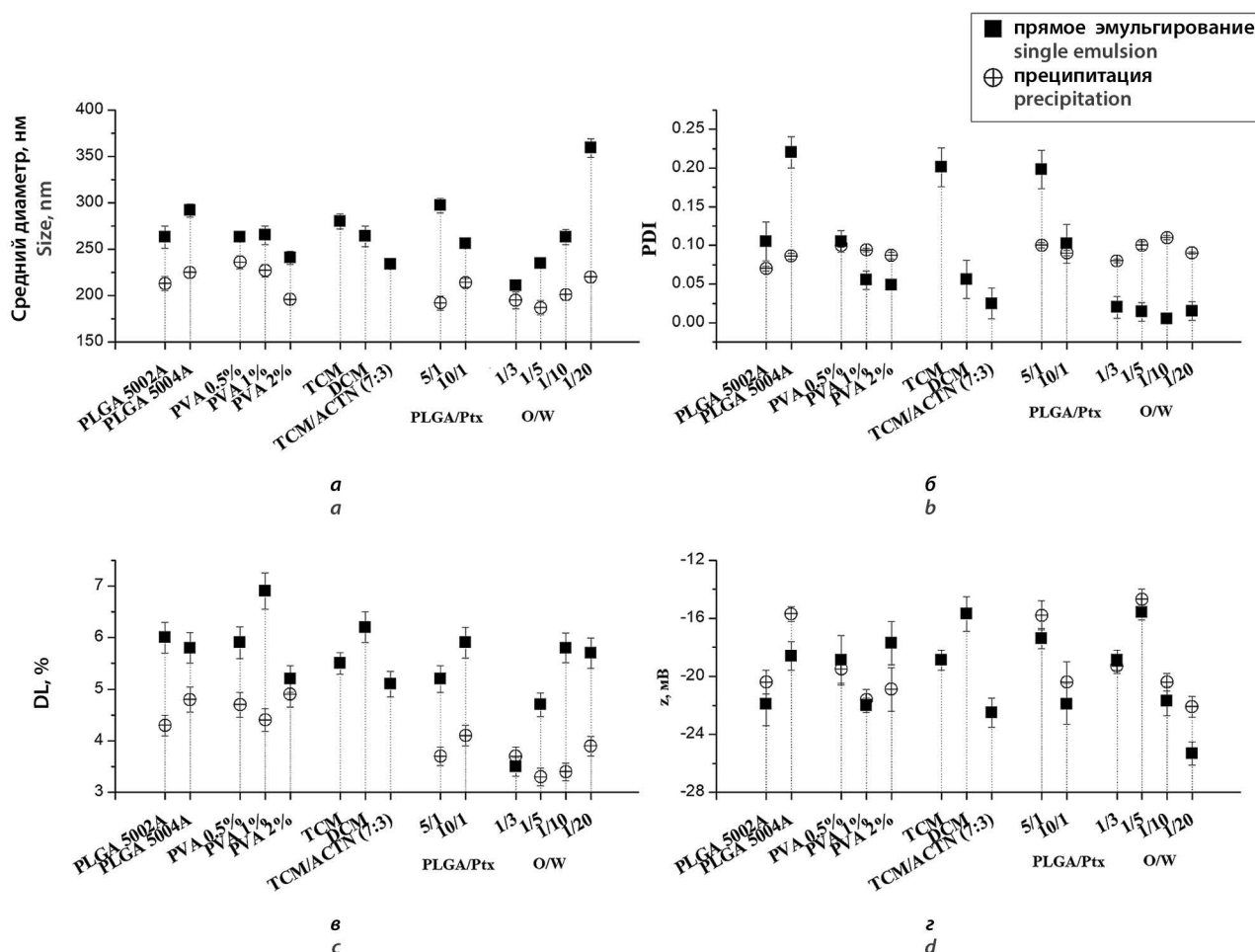


Рисунок 1. Подбор условий процесса получения наночастиц с паклитакселом методами прямого эмульгирования и преципитации (n = 3).

Зависимости: а – среднего диаметра, нм; б – индекса полидисперсности (PDI); в – общего содержания (DL, %); г – дзета-потенциала (z, мВ) от условий получения. PVA – поливиниловый спирт; TCM – хлороформ; DCM – дихлорметан; ACTN – ацетон

Figure 1. Optimization of paclitaxel loaded nanoparticles synthesis by direct emulsification and precipitation (n = 3).

Dependences: a – size, nm; b – polydispersity index (PDI); c – drug loading (DL, %); d – zeta potential (z, mV) on the preparation conditions. PVA – polyvinyl alcohol; TCM – chloroform; DCM – dichloromethane; ACTN – acetone

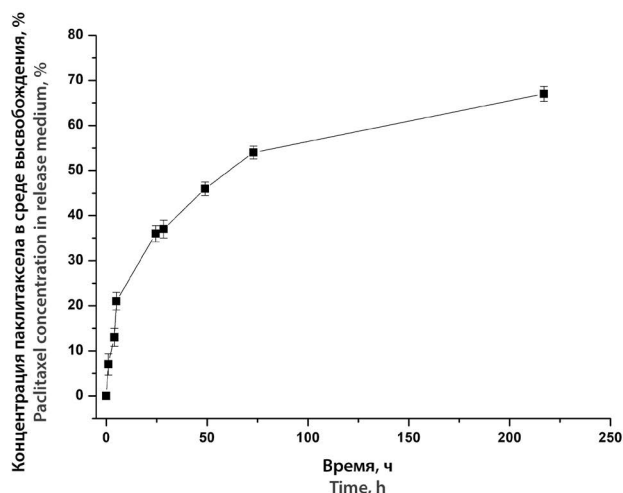


Рисунок 2. Кинетика высвобождения паклитаксела из rAFP3d-NP (среднее $\pm$ SD, $n = 3$)

Figure 2. Release kinetics of paclitaxel from rAFP3d-NP (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

ных групп 50:50 позволяет получить частицы с наименьшими размерами [15, 19]. Известно, что вязкость полимера также может влиять на размер частиц [20]. Таким образом, для проведения исследований были выбраны сополимеры PLGA-COOH (50:50) с вязкостью 0,2 и 0,4 см³/г (PLGA5002A и PLGA5004A соответственно).

В качестве стабилизатора эмульсии был выбран PVA в концентрациях 0,5, 1 и 2 %, поскольку он широко используется для получения полимерных наночастиц, и его эффективность в сравнении с другими стабилизаторами была доказана ранее [21].

К характеристикам органических растворителей, влияющих на размер частиц, можно отнести поверхностное натяжение и вязкость [22]. Для оценки влияния данных характеристик на параметры наночастиц были выбраны органические растворители: DCM, TCM, TCM/ACTN, в ряду которых значения поверхностного натяжения и вязкости уменьшаются [22]. В случае метода преципитации был использован ацетон, поскольку он является стандартным растворителем для данной методики [23].

Известно, что концентрация PLGA в органической фазе, а также соотношение объема органической фазы к водной (O:W), влияют на размеры и DL за счет изменения вязкости раствора [18]. Ранее нами было показано, что наиболее оптимальные массовые соотношения PLGA:Ptx составляют 5:1 и 10:1 соответственно [16]. Влияние указанных соотношений PLGA:Ptx, а также стандартных соотношений O:W (1:3, 1:5, 1:10 и 1:20) было исследовано в данной работе.

Метод преципитации позволил получить наночастицы с меньшими размерами по сравнению с методом прямого эмульгирования (рисунок 1). Однако при использовании последнего значения DL были

значительно выше, что свидетельствует о более эффективной инкапсуляции Ptx в наночастицы. В связи с чем далее подбор оптимальных параметров проводили по этому методу.

При дальнейшем исследовании были установлены оптимальные параметры получения наночастиц: полимер PLGA5002A, 1 % PVA, DCM в качестве органической фазы, соотношение PLGA:Ptx 10:1, соотношение O:W 1:10. Данные параметры позволили получить наночастицы с наименьшим средним диаметром (263 ± 8 нм) и максимальной эффективностью инкапсуляции (DL 6 масс. %). Полученные частицы обладали дзета-потенциалом $-21,7 \pm 1,4$ мВ, что указывает на их агрегационную устойчивость [24].

Разработка метода получения и обоснование состава rAFP3d-NP

Наиболее распространенным методом конъюгации аминсодержащих молекул с карбоксильными группами является карбодимидный, при использовании которого карбоксильные группы на поверхности частиц (PLGA-COOH) сначала активируются EDC с образованием промежуточного соединения O-ацилизо мочевины. Последующее добавление NHS приводит к образованию более стабильного N-гидроксисукцимидного эфира, который реагирует с первичными аминогруппами белковых молекул [12].

С целью оптимизации процесса получения конъюгата варьировали количество вносимых в реакцию массу EDC, NHS и белковой молекулы (rAFP3d), исходя из концентрации карбоксильных групп 6 мг KOH/г, указанной в спецификации. Мольное соотношение EDC:NHS составило 1:1. Добавление 20-, 10- и 5-кратного мольного избытка EDC и NHS позволило конъюгировать более 89 % внесенного в реакцию белка. Дальнейшее снижение количества EDC и NHS привело к снижению эффективности протекания реакции. Таким образом, использование 5-кратного мольного избытка EDC и NHS являлось оптимальным для данной реакции, поскольку позволяло обеспечивать высокую эффективность конъюгации при минимальных нагрузках.

Пятикратный мольный избыток молекулы rAFP3d использовали для определения максимально возможного связывания белка с карбоксильными группами, присутствующими на поверхности наночастиц. Количество конъюгированного белка определяли колориметрическим методом с бигинхониновой кислотой [25]. Последующее снижение концентрации rAFP3d проводили для уменьшения начальных нагрузок белка с сохранением максимальной эффективности конъюгации. Снижение концентрации белка до соотношения PLGA-COOH:rAFP3d 5:1 не оказывало значительного влияния ($p > 0,05$) на эффективность реакции (таблица 1), при этом концентрация связанного rAFP3d составила 13 масс. %. Эффективность связывания при использовании соотношения PLGA-COOH:rAFP3d 10:1 снизилась до 71 %.

Таблица 1. Оценка эффективности конъюгации векторной молекулы (rAFP3d) с наночастицами [n = 3, среднее ± стандартное отклонение (SD)]

Table 1. Evaluation of the conjugation efficiency [n = 3, mean ± standard deviation (SD)]

Мольные соотношения PLGA:rAFP3d Molar ratios PLGA:rAFP3d	Эффективность конъюгации rAFP3d, % Conjugation efficiency of rAFP3d, %
1:5	89 ± 3
1:1	92 ± 1
2:1	97 ± 2
5:1	95 ± 2
10:1	71 ± 2

Таким образом, было подобрано оптимальное соотношение PLGA-COOH:rAFP3d, равное 5:1, позволяющее при минимальных начальных нагрузках проводить эффективную конъюгацию (95 %) всех доступных на поверхности карбоксильных групп наночастиц с белком.

В качестве криопротекторов исследовали наиболее часто используемые в фармацевтической практике при лиофилизации наночастиц вещества – представители класса «углеводы»: сахароза, глюкоза и D-маннитол («многоатомные спирты»). Выбор криопротектора и его количества проводили, оценивая размер и дзета-потенциал rAFP3d-NP до (контроль) и после лиофилизации (таблица 2).

Таблица 2. Подбор криопротектора для лиофилизации rAFP3d-NP (n = 3, среднее ± SD)

Table 2. Selection of cryoprotectant for lyophilization of rAFP3d-NP (n = 3, mean ± SD)

№	Криопротектор Cryoprotectant	масс. % % w/w	Средний диаметр, нм Size, nm	Дзета-потенциал, мВ Zeta-potential, mV
1	Контроль Control	–	267 ± 8	–24 ± 4
2	Сахароза Sucrose	5	441 ± 4	–7,6 ± 1,6
3		10	302 ± 3	–11,2 ± 1,2
4	Глюкоза Glucose	5	537 ± 4	–9 ± 2
5		10	316 ± 3	–14 ± 5
6	D-маннитол D-mannitol	5	311 ± 9	–21 ± 2
7		10	280 ± 12	–27 ± 5

Использование сахарозы и глюкозы в качестве криопротекторов для получения rAFP3d-NP привело к увеличению среднего диаметра частиц и уменьшению их дзета-потенциала по сравнению с контролем. Частицы с наименьшим средним диаметром и наибольшим значением дзета-потенциала были получены при использовании D-маннитола с концентрацией 10 масс. %.

Исследование кинетики высвобождения паклитаксела из наночастиц

Изучение кинетики высвобождения Ptx из rAFP3d-NP проводили в среде 0,01 М раствора PBS с pH 7,4 при 37 °C. Соотношение массы навески rAFP3d-NP к объему среды рассчитывали, исходя из растворимости паклитаксела в PBS с pH 7,4 (0,3 мкг/мл) [26]. График высвобождения Ptx из rAFP3d-NP представляет собой двухфазный профиль с начальным «скачком» высвобождения паклитаксела (21 % за 5 ч), после чего наблюдается фаза замедленного высвобождения (см. рисунок 2). Вероятно, начальный «скачок» связан с высвобождением Ptx, адсорбированного на поверхности rAFP3d-NP, и с диффузией Ptx, распределенного рядом с поверхностью наночастиц [26]. Последующая фаза медленного высвобождения типична для диффузии вещества из внутренней полости наноразмерной формы и начала гидролитических процессов, приводящих к деградации полимера [26]. Количество Ptx в среде высвобождения за 220 ч составила 65 % от максимального значения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод получения наноразмерной формы паклитаксела в составе наночастиц PLGA, конъюгированных с белковой векторной молекулой. Оптимизация параметров получения наночастиц и подбор условий дальнейшей конъюгации позволили получить модифицированные наночастицы со средним диаметром 280 ± 12 нм, эффективность конъюгации составила 95 %. Изучена кинетика высвобождения паклитаксела из rAFP3d-NP *in vitro* и показана возможность пролонгированного высвобождения паклитаксела из полимерной матрицы.

ЛИТЕРАТУРА

- Боят В., Оганесян Е. А., Балабаньян В. Ю., Аляутдин Р. Н. Лекарственные формы паклитаксела. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009;8(3):37–44.
- Аляутдин Р. Н., Романов Б. К., Лепахин В. К., Бунятян Н. Д., Меркулов В. А., Миронов А. Н. Связанный с альбуминовыми наночастицами паклитаксел – первые шаги нанотехнологий в клиническую практику. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2014;2:10–16.
- Sofias A. M., Dunne M., Storm G., Allen C. The battle of "nano" paclitaxel. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;122:20–30. DOI: 10.1016/j.addr.2017.02.003.
- Dranitsaris G., Yu B., Wang L., Sun W., Zhou Ya., King J., Kaura S., Zhang A., Yuan P. Abraxane® versus Taxol® for patients with advanced breast cancer: A prospective time and motion analysis from a Chinese health care perspective. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2016;22(2):205–211. DOI: 10.1177/1078155214556008.
- Hoogenboezem E. N., Duvall C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;130:73–89. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
- Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*. 2012;161(2):505–522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- Mollaev M., Gorokhovets N., Nikolskaya E., Faustova M., Zabolotsky A., Zhunina O., Sokol M., Zamulaeva I., Severin E., Yabbarov N. Type of pH sensitive linker reveals different time-dependent intracellular localization, *in vitro* and *in vivo* efficiency in alpha-fetoprotein receptor targeted doxorubicin conjugate. *International*

- Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:138–146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.073.
8. Naz Z., Usman S., Saleem K., Ahmed S., Bashir H., Bilal M., Sumrin A. Alpha-fetoprotein: A fabulous biomarker in hepatocellular, gastric and rectal cancer diagnosis. *Biomedical Research*. 2018;29(12):2478–2483. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-17-1550.
9. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Antitumor activity of targeted nanosome delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, paclitaxel, and a recombinant alpha-fetoprotein fragment. *Nanotechnologies in Russia*. 2012;7(1–2):76–84. DOI: 10.1134/S1995078012010077.
10. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Dubovik E. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Targeted delivery of paclitaxel-loaded recombinant α -fetoprotein fragment-conjugated nanoparticles to tumor cells. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2011;439(1):158–160. DOI: 10.1134/S160767291104003X.
11. Albert C., Huang N., Tsapis N., Geiger S., Rosilio V., Mekhloufi G., Chapron D., Robin B., Beladjine M., Nicolas V., Fattal E., Agnely F. Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions. *Langmuir*. 2018;34(46):13935–13945. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02558.
12. Hermanson G. Bioconjugate techniques. 3rd Edition. Cambridge: Academic press; 2013. 1200 p.
13. Никольская Е. Д., Яббаров Н. Г., Сокол М. Б., Жунина О. А., Фаустова М. Р., Зabolotsky A. И., Фомичева М. В., Моллаев М. Д., Помазкова Т. А., Сапелкин М. А. Высокоэффективный способ получения лекарственной формы адресного действия для терапии злокачественных новообразований. Патент РФ на изобретение № RU 2727924 C1. 27.07.2020. Доступно по: <https://istina.msu.ru/patents/379152620/> Ссылка активна на 20.08.2021.
14. Терещенко О. Г., Никольская Е. Д., Жунина О. А., Заварзина В. В., Яббаров Н. Г., Фомичева М. В., Зубков Е. В., Сокол М. Б., Гукасова Н. В., Северин Е. С. Получение перспективных полимерных форм гепатопротекторов на основе силибина и урсодезокси-холовой кислоты. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2018;12:2290–2296.
15. Sokol M. B., Nikolskaya E. D., Yabbarov N. G., Zenin V. A., Faustova M. R., Belov A. V., Zhunina O. A., Mollaev M. D., Zabolotsky A. I., Tereshchenko O. G., Severin E. S. Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019;107(4):1150–1158. DOI: 10.1002/jbm.b.34208.
16. Sokol M., Zenin V., Yabbarov N., Mollaev M., Zabolotsky A., Mollaeva M., Fomicheva M., Kuznetsov S., Popenko V., Seregina I., Nikolskaya E. Validated HPLC method for paclitaxel determination in PLGA submicron particles conjugated with α -fetoprotein third domain: Sample preparation case study. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2021;79(5):500–510. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.02.001.
17. Никольская Е. Д., Яббаров Н. Г., Жунина О. А., Северин Е. С. Конъюгат противоопухолевых препаратов с рекомбинантным альфа-фетопроотеином и его функциональными фрагментами и способ их получения. Патент РФ на изобретение № 2630974. 15.09.2017. Доступно по: <https://edrid.ru/rid/218.016.060b.html>. Ссылка активна на 20.08.2021.
18. Feczko T., Tóth J., Dósa G., Gyenis J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2011;50(8):846–853. DOI: 10.1016/j.cep.2011.05.006.
19. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., Zhunina O., Mollaev M., Yabbarov N., Tereshchenko O., Popov R., Severin E. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2018;20(1):65–77. DOI: 10.5277/ABB-01028-02.
20. Haddadi A., Jahan S. T. Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2015;10(1):7371–7384. DOI: 10.2147/IJN.S90866.
21. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):157–163. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003.
22. Sahana D. K., Mittal G., Bhardwaj V., Kumar M. N. V. R. PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(4):1530–1542. DOI: 10.1002/jps.21158.
23. Lebouille J. G. J. L., Stepanyan R., Slot J. J. M., Stuart M. A. C., Tuinier R. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;460: 225–235. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.11.045.
24. Wan S., Zhang L., Quan Yu., Wei K. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *Royal Society Open Science*. 2018;5(11):181457. DOI: 10.1098/rsos.181457.
25. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1–4. М.: МЗ РФ; 2018. 7019 с.
26. Abouelmagd S. A., Sun B., Chang A. C., Ku Y. J., Yeo Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(3):997–1003. DOI: 10.1021/mp500817h.

REFERENCES

1. Bojat V., Oganasyan E. A., Balabanyan V. Yu., Alyautdin R. N. Development of therapeutic monoclonal antibodies for oncology: achievements and perspectives. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2009;8(3):37–44. (In Russ.)
2. Alyautdin R. N., Romanov B. K., Lepakhin V. K., Bunyatyan N. D., Merkulov V. A., Mironov A. N. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel – first step of nanotechnology into clinical practice. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2014;2:10–16. (In Russ.)
3. Sofias A. M., Dunne M., Storm G., Allen C. The battle of "nano" paclitaxel. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;122:20–30. DOI: 10.1016/j.addr.2017.02.003.
4. Dranitsaris G., Yu B., Wang L., Sun W., Zhou Ya., King J., Kaura S., Zhang A., Yuan P. Abraxane® versus Taxol® for patients with advanced breast cancer: A prospective time and motion analysis from a Chinese health care perspective. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2016;22(2):205–211. DOI: 10.1177/1078155214556008.
5. Hoogenboezem E. N., Duval C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;130:73–89. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
6. Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*. 2012;161(2):505–522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
7. Mollaev M., Gorokhovets N., Nikolskaya E., Faustova M., Zabolotsky A., Zhunina O., Sokol M., Zamulaeva I., Severin E., Yabbarov N. Type of pH sensitive linker reveals different time-dependent intracellular localization, in vitro and in vivo efficiency in alpha-fetoprotein receptor targeted doxorubicin conjugate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:138–146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.073.
8. Naz Z., Usman S., Saleem K., Ahmed S., Bashir H., Bilal M., Sumrin A. Alpha-fetoprotein: A fabulous biomarker in hepatocellular, gastric and rectal cancer diagnosis. *Biomedical Research*. 2018;29(12):2478–2483. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-17-1550.
9. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Antitumor activity of targeted nanosome delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, paclitaxel, and a recombinant alpha-fetoprotein fragment. *Nanotechnologies in Russia*. 2012;7(1–2):76–84. DOI: 10.1134/S1995078012010077.
10. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Dubovik E. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Targeted delivery of paclitaxel-loaded recombinant α -fetoprotein fragment-conjugated nanoparticles to tumor cells. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2011;439(1):158–160. DOI: 10.1134/S160767291104003X.
11. Albert C., Huang N., Tsapis N., Geiger S., Rosilio V., Mekhloufi G., Chapron D., Robin B., Beladjine M., Nicolas V., Fattal E., Agnely F. Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions. *Langmuir*. 2018;34(46):13935–13945. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02558.
12. Hermanson G. Bioconjugate techniques. 3rd Edition. Cambridge: Academic press; 2013. 1200 p.

13. Nikol'skaya E. D., Yabbarov N. G., Sokol M. B., Zhunina O. A., Faustova M. R., Zabolotskiy A. I., Fomicheva M. V., Mollaev M. D., Pomazkova T. A., Sapelkin M. A. *Vysokoeffektivnyy sposob polucheniya lekarstvennoy formy adreznogo deystviya dlya terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy* [Highly effective method for preparing dosage form of targeted action for therapy of malignant growth]. Patent RUS № 2727924 C1. 27.07.2020. Available at: <https://istina.msu.ru/patents/379152620/> Accessed: 20.08.2021. (In Russ.)
14. Tereshchenko O. G., Nikolskaya E. D., Zhunina O. A., Zavarzina V. V., Yabbarov N. G., Fomicheva M. V., Zubkov E. V., Sokol M. B., Gukasova N. V., Severin E. S. Formulation of perspective hepatoprotector polymeric forms based on silybin and ursodeoxycholic acid. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya = Russian Chemical Bulletin*. 2018;12:2290–2296. (In Russ.)
15. Sokol M. B., Nikolskaya E. D., Yabbarov N. G., Zenin V. A., Faustova M. R., Belov A. V., Zhunina O. A., Mollaev M. D., Zabolotsky A. I., Tereshchenko O. G., Severin E. S. Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019;107(4):1150–1158. DOI: 10.1002/jbm.b.34208.
16. Sokol M., Zenin V., Yabbarov N., Mollaev M., Zabolotsky A., Mollaeva M., Fomicheva M., Kuznetsov S., Popenko V., Seregina I., Nikolskaya E. Validated HPLC method for paclitaxel determination in PLGA submicron particles conjugated with α -fetoprotein third domain: Sample preparation case study. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2021;79(5):500–510. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.02.001.
17. Nikol'skaya E. D., Yabbarov N. G., Zhunina O. A., Severin E. S. *Kon'yugat protivopukholevykh preparatov s rekombinantnym α -fetoproteinom i ego funktsional'nymi fragmentami i sposob ikh polucheniya* [Conjugate of anticancer drugs with recombinant α -fetoprotein and its functional fragments and method for their preparation]. Patent RUS № 2630974. 15.09.2017. Available at: <https://edrid.ru/rid/218.016.060b.html>. Accessed: 20.08.2021. (In Russ.)
18. Feczko T., Tóth J., Dósa G., Gyenis J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2011;50(8):846–853. DOI: 10.1016/j.cep.2011.05.006.
19. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., Zhunina O., Mollaev M., Yabbarov N., Tereshchenko O., Popov R., Severin E. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2018;20(1):65–77. DOI: 10.5277/ABB-01028-02.
20. Haddadi A., Jahan S. T. Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2015;10(1):7371–7384. DOI: 10.2147/IJN.S90866.
21. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):157–163. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003.
22. Sahana D. K., Mittal G., Bhardwaj V., Kumar M. N. V. R. PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(4):1530–1542. DOI: 10.1002/jps.21158.
23. Lebouille J. G. J. L., Stepanyan R., Slot J. J. M., Stuart M. A. C., Tuinier R. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;460: 225–235. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.11.045.
24. Wan S., Zhang L., Quan Yu., Wei K. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *Royal Society Open Science*. 2018;5(11):181457. DOI: 10.1098/rsos.181457.
25. *Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. V. 1–4. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 7019 p. (In Russ.)
26. Abouelmagd S. A., Sun B., Chang A. C., Ku Y. J., Yeo Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(3):997–1003. DOI: 10.1021/mp500817h.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-89-95>
УДК 615.454.12



Оригинальная статья / Research article

Оптимизация состава мази с фитоэкдистероидами серпистена

Е. И. Молохова¹, Ю. В. Сорокина^{1*}, Д. Е. Липин²

¹ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА), 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

² ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», 623856, Россия, Свердловская область, г. Ирбит, ул. Кирова, д. 172

*Контактное лицо: Сорокина Юлия В. E-mail: sorokinayulia@yandex.ru

ORCID: Е. И. Молохова – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>; Ю. В. Сорокина – <https://orcid.org/0000-0001-9114-7208>; Д. Е. Липин – <https://orcid.org/0000-0002-8160-1224>.

Статья поступила: 26.10.2020

Статья принята в печать: 06.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Фитоэкдистероиды – группа природных соединений, родственных по структуре и физиологическому действию экдизону – гормону линьки насекомых. Установлено, что фитоэкдистероиды обладают противовоспалительным действием, что дает основание полагать наличие у них регенерирующих свойств. Представляет интерес разработка мягкой лекарственной формы, содержащей фитоэкдистероиды.

Цель. Совершенствование мазевых композиций с фитоэкдистероидами путем оптимизации состава вспомогательных веществ основы.

Материалы и методы. В качестве активной субстанции использовали серпистен, содержащий сумму фитоэкдистероидов, основным из которых является 20-гидроксизекдизон и получаемый из листьев *Serratula coronata* L. Сырье серпухи венценосной листья зарегистрировано Федеральной службой Роспотребнадзора (г. Москва) для получения БАД (Гр № 77.99.23.3.У.1922.3.08), субстанция серпистен (Гр № 77.99.23.3.У.1923.3.08. ТУ 9369-002-15092611-2008). В работе использовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению: моноглицериды дистиллированные, эмульгатор Т-2, твин-80, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, поливиниловый спирт, гидроксид алюминия, аэросил, вазелин, масло вазелиновое, масло подсолнечное. Оптимизацию состава вспомогательных веществ мази проводили по плану греко-латинского квадрата 4 × 4 с повторными наблюдениями. В качестве технологических параметров оценивали концентрацию водородных ионов водных извлечений мазей; кислотное число; высвобождение серпистена из мази в агаровый гель, термостабильность структуры. Структурно-механические свойства мазевой композиции оптимального состава определяли на ротационном вискозиметре RHEOTEST RV 2.1 (RHEOTEST Medingen GmbH, Германия). В качестве препарата сравнения использовали мазь «Бепантен» (GP Grenzach Produktions GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение. В ходе оптимизации состава дифильной мази с серпистеном установлено, что соотношение гидрофобной и гидрофильной фаз должно быть 1:1, в мазевую основу целесообразно вводить эмульгатор Т-2, аэросил и смесь вазелина и вазелинового масла в пропорции 1:1. В результате проведенных исследований по оптимизации мазевых композиций предложен следующий состав мази серпистена: серпистен – 0,02; эмульгатор Т-2 – 3,0; аэросил – 3,0; вазелин – 23,0; масло вазелиновое – 23,0; спирт этиловый 40 % – 1 мл; вода очищенная до 100,0. Сравнительный анализ эффективной вязкости показал, что предлагаемый состав по этому показателю максимально приближен к вязкости мази «Бепантен».

Заключение. Выполнен комплекс технологических исследований по оптимизации состава мази серпистена 0,02 % на дифильной основе. Разработанный состав и технология позволили получить композицию, обладающую термостабильностью, приблизить водородный показатель мази к рН кожи человека и добиться параметров, входящих в реологический оптимум для дерматологических мазей (0,34–108 Па · с).

Ключевые слова: мазь, фитоэкдистероиды, вспомогательные вещества, показатели качества, реологические характеристики

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

Вклад авторов. Е. И. Молоховой, Ю. В. Сорокиной, Д. Е. Липиным выбрано научное направление работы, составлен план исследования. Ю. В. Сорокиной проведено экспериментальное исследование по получению мазевых композиций. Д. Е. Липиным проведен анализ физико-химических и технологических свойств мягких лекарственных форм с серпистеном. Е. И. Молохова, Д. Е. Липин участвовали в обработке и анализе полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и подготовке текста статьи.

Для цитирования: Молохова Е. И., Сорокина Ю. В., Липин Д. Е. Оптимизация состава мази с фитоэкдистероидами серпистена. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):89–95. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-89-95>

Optimization of the Composition of the Ointment with Phytoecdysteroids Serpisten

Elena I. Molokhova¹, Yuliya V. Sorokina^{1*}, Daniil E. Lipin²

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, Perm Territory, 614990, Russia

² OJSC "Irbitsk chemical and pharmaceutical plant", 172, Kirova str., Irbit, Sverdlovsk region, 623856, Russia

*Corresponding author: Yuliya V. Sorokina. E-mail: sorokinayulia@yandex.ru

ORCID: Elena I. Molokhova – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>; Yuliya V. Sorokina – <https://orcid.org/0000-0001-9114-7208>; Daniil E. Lipin – <https://orcid.org/0000-0002-8160-1224>.

Received: 26.10.2020

Revised: 06.10.2021

Published: 25.11.2021

© Молохова Е. И., Сорокина Ю. В., Липин Д. Е., 2021

© Molokhova E. I., Sorokina Yu. V., Lipin D. E., 2021

Abstract

Introduction. Phytoecdysteroids are a group of natural compounds related in structure and physiological effect to ecdysone – the hormone of insect molting. Phytoecdysteroids have been found to have an anti-inflammatory effect, which suggests that they have regenerative properties. The development of a soft dosage form containing phytoecdysteroids is of interest.

Aim. Improvement of ointment compositions with phytoecdysteroids by optimizing the composition of base adjuvants.

Materials and methods. As an active substance was used Serpisten, containing the sum of phytoecdysteroids, the main of which is 20-hydroxyecdysone and obtained from the leaves of *Serratulae coronatae*. Raw materials "Serpukhi crowned leaves" were registered by the Federal Service Rospotrebnadzor (Moscow) for the production of dietary supplements (Gr. No. 77.99.23.3.U.1922.3.08), substance Serpisten (Gr. No. 77.99.23.3.U.1923.3.08. TU 9369-002-15092611-2008). In work were used the excipients allowed for medical use: the monoglycerides distilled, T-2 emulsifier, tween 80, sodium – carboxymethylcellulose, polyvinyl alcohol, hydroxide of aluminum, aerox, vaseline, oil vaseline, sunflower oil. Optimization of ointment auxiliary substances composition was carried out according to the Greco-Latin 4 × 4 square plan with repeated observations. The concentration of hydrogen ions from aqueous ointments was evaluated as process parameters; acid number; release of serpistene from ointment into agar gel, thermal stability of structure. The structural and mechanical properties of the optimal composition ointment composition were determined on a RV type REOTEST 2.1 rotary viscometer (RHEOTEST Medingen GmbH, Germany). Ointment Bepanten (GP Grenzsch Production GmbH, Germany) was used as a comparison preparation.

Results and discussion. During optimization of the composition of the diphilic ointment with serpistene, was found that the ratio of hydrophobic and hydrophilic phases should be 1:1, it is advisable to introduce into the ointment base an emulsifier T-2, aerosil and a mixture of vaseline and vaseline oil in the proportion of 1:1. As a result of the carried out studies on the optimization of ointment compositions, the following serpisten ointment composition is proposed: serpisten – 0.02; emulsifier T-2 – 3.0; aerosil – 3.0; vaseline – 23.0; vaseline oil – 23.0; ethyl alcohol 40 % – 1 ml; purified water to 100.0. Comparative analysis of effective viscosity showed that the proposed composition is as close as possible to the Bepanten ointment.

Conclusion. A set of technological studies was carried out to optimize the composition of the Serpisten, 0.02 % ointment on a diphilic basis. The developed composition and technology made it possible to obtain a composition with thermal stability, bring the hydrogen index of the ointment closer to the pH of human skin and achieve the parameters included in the rheological optimum for dermatological ointments (0.34–108 Pa · s).

Keywords: ointment, phytoecdysteroids, excipients, quality indicators, rheological characteristics

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

Contribution of the authors. Elena I. Molokhova, Yuliya V. Sorokina, Daniil E. Lipin selected the scientific field of work, drew up a study plan. Yuliya V. Sorokina conducted an experimental study on the preparation of ointment compositions. Daniil E. Lipin analyzed the physicochemical and technological properties of soft dosage forms with serpisten. Elena I. Molokhova, Daniil E. Lipin participated in the processing and analysis of the obtained data. All authors participated in the discussion of the results and the preparation of the text of the article.

For citation: Molokhova E. I., Sorokina Yu. V., Lipin D. E. Optimization of the composition of the ointment with phytoecdysteroids serpisten. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):89–95. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-89-95>

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность создания лекарственных средств на основе фитоэкдистероидов подтверждается рядом научных публикаций, содержащих экспериментальные данные по широкому спектру их фармакологических эффектов от адаптогенного до репаративного [1–7]. В последнее время актуализировался поиск новых растительных источников, содержащих фитоэкдистероиды [8–10]. Получена культура генетически трансформированных корней (*hairy roots*) *Silene aemeri* Friv. как источника фитоэкдистероидов [11].

Среди доступных источников фитоэкдистероидов можно выделить культивируемое сырье серпухи венценосной листья. Несмотря на то, что серпуха венценосная не является фармакопейным растением, содержание фитоэкдистероидов в ней на порядок выше, чем в сырье левзеи сафлоровидной [5]. Исследователями Института биологии Коми НЦ Уро РАН разработана технология активной субстанции серпистена, включающей в себя семь фитоэкдистероидов с преобладанием 20-гидроксиэкдизона [12].

Особый интерес представляет разработка и совершенствование мягких лекарственных форм с фитоэкдистероидами, так как они показали хорошие результаты в гнойной хирургии, лечении термических и химических ожогов [5]. В 1998–2001 годах запатентованы составы мазей «Виспосил», «Валеодонт», «Висподент», «Витадерм» на основе суммарных препаратов фитоэкдистероидов из растений родов *Silene*, *Ajuga*, *Serratula*. Основы вышеуказанных мазей включают большое количество вазелина, который, как известно, нарушает газообмен, плохо высвобождает лекарственные вещества и обладает низкой осмотической и адсорбционной активностью [13].

На базе ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» проведены исследования по разработке мазевых композиций, содержащих серпистен, оценены их реологические параметры. Установлена зависимость высвобождения активной субстанции из мазей от природы основы. Наилучшие результаты по высвобождению серпистена показала композиция на дифильной основе, включающая: сер-

пистен; спирт этиловый; вазелиновое масло; вазелин; МГД; аэросил; вода очищенная [14].

Результаты исследования структурно-механических свойств указывают на то, что дифильная мазь, содержащая серпистен, в отличие от гидрофобной и гидрофильной композиции, укладывается в реологический оптимум, характеризующийся эффективной вязкостью 0,34–108 Па·с – для мазей гидрофильной природы и 0,32–93,3 Па·с – для гидрофобной природы. Однако мазь предложенного состава имеет недостаточно широкую петлю гистерезиса и меньшее значение предельного напряжения сдвига по сравнению с мазью «Бепантен», включающей декспантенол, протегин Х, спирт цетиловый, спирт стеариловый, воск пчелиный белый, ланолин, парафин мягкий белый, масло миндальное, парафин жидкий, воду очищенную (GP Grenzach Produktions GmbH, Германия) [14]. Наличие широкой петли гистерезиса у препарата сравнения свидетельствует об устойчивых структурно-механических свойствах. Более низкий показатель напряжения сдвига дифильной композиции с серпистеном говорит о необходимости внесения в состав композиции загустителей [15].

С целью совершенствования композиций мазей проведена оптимизация состава вспомогательных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве активной субстанции использовали серпистен – стандартный очищенный препарат фито-экдистероидов серпухи венценосной, полученный в лаборатории биохимии и биотехнологии растений института биологии Коми НЦ УрО РАН. Серпистен вводили в основу в виде водно-спиртового раствора в соотношении 1:50 до содержания в мази 0,02 %.

При выборе состава мази исследовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению: эмульгаторы моноглицериды дистиллированные (МГД) (ТУ 10-1197-95, АО «Нижегородский масло-жировой комбинат»), эмульгатор Т-2 (ТУ 10-1198-95, ЗАО «Ласкрафт»), твин-80 (ТУ 16-14-938-79, АО «БЕК-ТОН»); загустители: натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ) (ТУ 2231-001-68373646-2010, АО «БЕК-ТОН»), поливиниловый спирт (ПВС) (ГОСТ 10779-78, ОАО «Невинномысский Азот», Россия), гидроксид алюминия (Филиал АО НПО «Микроген» г. Пермь, Пермское НПО «Биомед»), аэросил (ТУ 24.1-31695418-002-2003, АО «БЕК-ТОН»); гидрофобная фаза: вазелин (ГОСТ 3582-84, ЗАО «СП «Химпром»), масло вазелиновое (ЛСР-007829/08-061008 с изменениями № 1–8, АО «Медхим»), масло подсолнечное (ГОСТ 1129-2013, ООО «Алтайский подсолнух»).

Технология мазей включала следующие технологические приемы: эмульгаторы сплавляли с гидрофобной основой; загустители – ПВС, Na-КМЦ, гидроксид алюминия и аэросил – вводили в виде гелей и суспензий.

Водно-спиртовой раствор серпистена вводили вместе с остальными гидрофильными компонентами в сплав основы и эмульгатора по типу эмульсии.

Исследование влияния свойств вспомогательных веществ на технологические параметры проводили по плану греко-латинского квадрата 4×4 с повторными наблюдениями. В качестве технологических параметров оценивали pH мазей (ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия»), кислотное число (ОФС 1.2.3.0004.15 «Кислотное число»), высвобождение серпистена из мази.

При использовании метода диффузии в агаровый гель применяли 2%-й агаровый гель следующего состава: 20,0 агара микробиологического, 8,9 г натрия хлорида, 0,3 г калия хлорида, 0,39 г кальция хлорида, очищенной воды до 1000 мл. В качестве индикатора использовали 4 мл 10%-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина, который вводили в процессе приготовления геля.

Полученный раствор геля разливали в чашки Петри и выдерживали в течение 24 ч. В геле металлическим цилиндром ($d = 8$ мм) вырезали лунки, в которые помещали исследуемые образцы мазей (0,3 г). Систему термостатировали при температуре 37 °С 24 часа, после чего определяли размеры окрашенных в интенсивно-коричневый цвет зон вокруг каждой выемки соответствующей мази с помощью миллиметровой бумаги.

Структурно-механические свойства мазевой композиции оптимального состава определяли на ротационном вискозиметре RHEOTEST RV 2.1 (RHEOTEST Medingen GmbH, Германия). Проводили три измерения с интервалом в 30 мин при температуре 30 °С (масса навески образца – 0,1 г). Скорость вращения конуса изменяли последовательно от 0,333 до 145,8 оборотов в секунду (по 12 скоростям вращения) и после достижения максимального для данного прибора касательного напряжения сдвига последовательно уменьшали скорость вращения. Обработку экспериментальных данных проводили по разработанной программе REOTEST на персональном компьютере.

Мазь «Бепантен» выбрана в качестве препарата сравнения для проведения реологических исследований вследствие того, что предварительными исследованиями по реологии и высвобождению серпистена из мазей наилучшие результаты показала композиция на дифильной основе. Мазь «Бепантен» является также дифильной, обладает схожими показаниями к применению, ее структурно-механические характеристики укладываются в рамки реологического оптимума для дифильных мазей, что указывает на возможность использования ее в качестве препарата сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оптимизации состава мази выбраны факторы, оказывающие влияние на качество мазевых композиций с серпистеном: процент гидрофильной фазы: $A_1 - 10\%$, $A_2 - 30\%$, $A_3 - 50\%$, $A_4 - 75\%$; вид эмульгатора

ра: B_1 – МГД, B_2 – эмульгатор Т-2, B_3 – твин-80, B_4 – смесь эмульгатора Т-2 и МГД; вид загустителя: C_1 – Na-КМЦ, C_2 – ПВС, C_3 – гель гидроксида алюминия, C_4 – аэросил; природа гидрофобной фазы: D_1 – вазелин, D_2 – масло вазелиновое, D_3 – смесь вазелина и масла вазелинового, D_4 – масло подсолнечное.

В ходе проведения экспериментов получено 16 мазевых композиций, составы которых представлены в таблице 1. Содержание серпистена во всех композициях составляло – 0,02 г. Полученные мазевые композиции выдерживали в прохладном месте (ОФС 1.1.0010.15 «Хранение лекарственных средств») в течение 24 часов, после чего проводили оценку по внешнему виду.

Шесть мазевых композиций имели удовлетворительный внешний вид и представляли собой однородные мази, мягкой консистенции, белые с желтоватым оттенком или бежевого цвета (составы 1, 2, 3, 5, 10, 12).

Остальные составы (4, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16) в течение 24 часов хранения расслаивались.

На следующем этапе определяли такие показатели качества модельных композиций мазей, как pH водной вытяжки, кислотное число и высвобождение серпистена в агаровый гель. В таблице 2 приведены данные среднего значения трех опытов по определению показателей.

При определении pH мазевых композиций установлено, что значения находятся в пределах от 5,69 до 6,65.

Дисперсионный анализ показателя pH по критерию Фишера (таблица 3) показал, что на водородный показатель водной вытяжки существенное влияние оказывают вид загустителя ($F_{\text{расч.}} 8,45 > F_{\text{кр.}} 4,76$) и эмульгатора ($F_{\text{расч.}} 8,29 > F_{\text{кр.}} 4,76$) а также процент гидрофильной фазы ($F_{\text{расч.}} 5,14 > F_{\text{кр.}} 4,76$).

Таблица 1. Состав мазевых композиций с серпистеном

Table 1. Formulation of ointment compositions with seripsten

№	Компоненты, г Components, g			
1	МГД 3,0 Distilled monoglycerides 3.0	Гель Na-КМЦ 3,0 Gel Na-CMC 3.0	Вазелин 87,0 Vaseline 87.0	Вода очищенная 7,0 Purified water 7.0
2	Т-2 10,0 Emulsifier T2 10.0	Гель ПВС 10,0 PVA gel 10.0	Масло вазелиновое 80,0 Vaseline oil 80.0	–
3	Твин-80 1,0 Tween 80 1.0	Гель гидроксида алюминия 10,0 Aluminium hydroxide gel 10.0	Вазелин : масло вазелиновое (1:1) 89,0 Vaseline : Vaseline oil (1:1) 89.0	–
4	Т-2 – МГД (1:1) 5,0 Emulsifier T2 – Distilled monoglycerides (1:1) 5.0	Аэросил 5,0 Aerosil 5.0	Масло подсолнечное 80,0 Sunflower oil 80.0	Вода очищенная 10,0 Purified water 10.0
5	МГД 3,0 Distilled monoglycerides 3.0	Гель ПВС 5,0 PVA gel 5.0	Вазелин : масло вазелиновое (1:1) 67,0 Vaseline : Vaseline oil (1:1) 67.0	Вода очищенная 25,0 Purified water 25.0
6	Т-2 10,0 Emulsifier T2 10.0	Гель Na-КМЦ 3,0 Gel Na-CMC 3.0	Масло подсолнечное 60,0 Sunflower oil 60.0	Вода очищенная 27,0 Purified water 27.0
7	Твин-80 1,0 Tween 80 1.0	Аэросил 5,0 Aerosil 5.0	Вазелин 64,0 Vaseline 64.0	Вода очищенная 30,0 Purified water 30.0
8	Т-2 – МГД (1:1) 5,0 Emulsifier T2 – Distilled monoglycerides (1:1) 5.0	Гель гидроксида алюминия 10,0 Aluminium hydroxide gel 10.0	Масло вазелиновое 65,0 Vaseline oil 65.0	Вода очищенная 20,0 Purified water 20.0
9	МГД 3,0 Distilled monoglycerides 3.0	Гель гидроксида алюминия 10,0 Aluminium hydroxide gel 10.0	Масло подсолнечное 47,0 Sunflower oil 47.0	Вода очищенная 40,0 Purified water 40.0
10	Т-2 10,0 Emulsifier T2 10.0	Аэросил 5,0 Aerosil 5.0	Вазелин : масло вазелиновое (1:1) 35,0 Vaseline : Vaseline oil (1:1) 35.0	Вода очищенная 50,0 Purified water 50.0
11	Твин-80 1,0 Tween 80 1.0	Гель Na-КМЦ 3,0 Gel Na-CMC 3.0	Масло вазелиновое 49,0 Vaseline oil 49.0	Вода очищенная 47,0 Purified water 47.0
12	Т-2 – МГД (1:1) 5,0 Emulsifier T2 – Distilled monoglycerides (1:1) 5.0	Гель ПВС 5,0 PVA gel 5.0	Вазелин 66,0 Vaseline 66.0	Вода очищенная 24,0 Purified water 24.0
13	МГД 3,0 Distilled monoglycerides 3.0	Аэросил 5,0 Aerosil 5.0	Масло вазелиновое 15,0 Vaseline oil 15.0	Вода очищенная 77,0 Purified water 77.0
14	Т-2 10,0 Emulsifier T2 10.0	Гель гидроксида алюминия 10,0 Aluminium hydroxide gel 10.0	Вазелин 15,0 Vaseline 15.0	Вода очищенная 65,0 Purified water 65.0
15	Твин-80 1,0 Tween 80 1.0	Гель ПВС 5,0 PVA gel 5.0	Масло подсолнечное 24,0 Sunflower oil 24.0	Вода очищенная 70,0 Purified water 70.0
16	Т-2 – МГД (1:1) 5,0 Emulsifier T2 – Distilled monoglycerides (1:1) 5.0	Гель Na-КМЦ 3,0 Gel Na-CMC 3.0	Вазелин : масло вазелиновое (1:1) 20,0 Vaseline : Vaseline oil (1:1) 20.0	Вода очищенная 72,0 Purified water 72.0

Таблица 2. Показатели качества мазевых композиций с серпистеном

Table 2. Quality indicators of ointment compositions with seripisten

№ состава № composition	pH	Кислотное число, мг Acid number, mg	Высвобождение фитоэкдистероидов, мм Phytoecdysteroid release, mm
1	6,59 ± 0,29	0,28 ± 0,01	6,00 ± 0,30
2	5,69 ± 0,23	0,17 ± 0,01	6,00 ± 0,36
3	6,35 ± 0,25	0,22 ± 0,01	13,00 ± 0,91
4	6,20 ± 0,18	2,75 ± 0,08	6,00 ± 0,33
5	6,51 ± 0,30	0,11 ± 0,01	6,00 ± 0,54
6	6,55 ± 0,05	0,73 ± 0,01	6,00 ± 0,45
7	6,36 ± 0,28	0,39 ± 0,01	6,00 ± 0,24
8	6,60 ± 0,23	0,17 ± 0,01	6,00 ± 0,49
9	6,29 ± 0,27	0,34 ± 0,01	6,00 ± 0,30
10	6,14 ± 0,19	0,62 ± 0,02	6,00 ± 0,44
11	6,49 ± 0,27	0,22 ± 0,01	14,00 ± 0,55
12	6,39 ± 0,21	0,11 ± 0,01	6,00 ± 0,43
13	6,26 ± 0,23	0,79 ± 0,02	6,00 ± 0,23
14	6,08 ± 0,16	0,28 ± 0,01	6,00 ± 0,33
15	6,35 ± 0,22	0,22 ± 0,01	15,00 ± 0,62
16	6,65 ± 0,29	0,11 ± 0,01	6,00 ± 0,37

Таблица 3. Дисперсионный анализ результатов определения pH

Table 3. Variance analysis of pH results

Источник дисперсии Dispersion source	Число степеней свободы (f) Number of degrees of freedom (f)	Сумма квадратов (SS) Sum of squares (SS)	Средний квадрат (MS) Middle Square (MS)	F _{расч.} F _{calc.}	F _{табл.} F _{table.}
A	3	0,18	0,06	5,14	4,76
B	3	0,29	0,10	8,29	4,76
C	3	0,30	0,10	8,45	4,76
D	3	0,05	0,02	1,36	4,76
Остаток Rest	6	0,07	0,01	–	–
Общая сумма Total amount	15	0,88	–	–	–

Для статистически значимых факторов проведены множественные сравнения с использованием рангового критерия Дункана. Ряды предпочтительности для фактора А имели следующий вид: 10 % гидрофильной фазы (A₁) > 50 % (A₃), для фактора В: эмульгатор Т-2 (B₂) > МГД (B₁), а для фактора С: аэросил (C₄) > ПВС (C₂). Полученные данные свидетельствуют о необходимости использования в качестве вспомогательных веществ эмульгатора второго рода (эмульгатор Т-2) и загустителя аэросила для стабилизации мазевой композиции при соотношении гидрофобной и гидрофильной фаз 1:1.

Результаты дисперсионного анализа показателя «Кислотное число» представлены в таблице 4.

Таблица 4. Дисперсионный анализ результатов определения показателя «Кислотное число»

Table 4. Dispersion analysis of the results of determining the acid number

Источник дисперсии Dispersion source	Число степеней свободы (f) Number of degrees of freedom (f)	Сумма квадратов (SS) Sum of squares (SS)	Средний квадрат (MS) Middle Square (MS)	F _{расч.} F _{calc.}	F _{табл.} F _{table.}
A	3	0,80	0,27	1,93	4,76
B	3	0,60	0,20	1,46	4,76
C	3	2,45	0,82	5,94	4,76
D	3	1,57	0,53	3,82	4,76
Ошибка Rest	6	0,83	0,14	–	–
Общая сумма Total amount	15	6,24	–	–	–

Показатель F-критерия указывает на существенное влияние на кислотное число фактора С (загуститель). Согласно ранговому критерию Дункана получен следующий ряд предпочтительности: аэросил > Na-КМЦ > алюминия гидроксид > ПВС. Наименьшее значение кислотного числа мази с серпистеном наблюдается, когда гидрофильная фаза составляет 50 % от массы модельного образца, в качестве эмульгатора выступает МГД или эмульгаторы Т-2 и МГД, а гидрофобная фаза представлена смесью вазелина и вазелинового масла.

Результаты дисперсионного анализа при изучении влияния изучаемых факторов на высвобождение фитотокдистероидов отражены в таблице 5.

Таблица 5. Дисперсионный анализ результатов определения высвобождения фитоэкдистероидов

Table 5. Dispersion analysis of phytoecdysteroid release results

Источник дисперсии Dispersion source	Число степеней свободы (f) Number of degrees of freedom (f)	Сумма квадратов (SS) Sum of squares (SS)	Средний квадрат (MS) Middle Square (MS)	F _{расч.} F _{calc.}	F _{табл.} F _{table.}
A	3	12,5	4,17	2,00	4,76
B	3	108	36,00	17,28	4,76
C	3	12,5	4,17	2,00	4,76
D	3	12,5	4,17	2,00	4,76
Ошибка Rest	6	12,5	2,08	–	–
Общая сумма Total amount	15	158	–	–	–

При этом высвобождение фитоэкдистероидов из составов 3, 11, 15 достоверно отличалось от остальных композиций в лучшую сторону.

Однако дополнительными исследованиями установлено, что твин-80 дает окраску при взаимодействии с индикатором. Таким образом, не выявлено влияния изучаемых составов мазей на высвобождение серпистана.

Следовательно, в ходе оптимизации состава дифильной мази с серпишеном установлено, что соотношение гидрофобной и гидрофильной фаз должно быть 1:1, в мазевую основу целесообразно вводить эмульгатор Т-2, аэросил и смесь вазелина и вазелинового масла в пропорции 1:1.

В ходе экспериментальных исследований установлены условия стерилизации предлагаемой основы, позволяющей использовать ее в составе мазей ранозаживляющего действия: термическая стерилизация в течение 30 минут при 110 °С, 0,5 атм. Стерилизацию мазевых основ проводили в стеклянных термостойких флаконах с ватно-марлевыми пробками под обвязку с последующим определением показателей pH и кислотного числа. После стерилизации данный образец обладал однородной консистенцией со значением pH 7,19 и кислотного числа 0,28.

В результате проведенных исследований по оптимизации мазевых композиций с серпишеном предложен следующий состав:

Серпистен – 0,02.

Эмульгатор Т-2 – 3,0.

Аэросил – 3,0.

Вазелин – 23,0.

Масло вазелиновое – 23,0.

Спирт этиловый 40%-й – 1 мл.

Вода очищенная до 100,0.

Сравнительный анализ эффективной вязкости показал, что вязкость предлагаемого состава находится в границах оптимума как гидрофильных, так и гидрофобных мазей (рисунок 1).

На рисунке 1 показано, что состав мази после оптимизации имеет лучшие реологические параметры: более широкую петлю гистерезиса и более высокие значения напряжения сдвига в сравнении с исходным составом мази. Таким образом, оптимизация состава дифильной мази позволила улучшить его реологические характеристики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнен комплекс технологических исследований по оптимизации состава мази серпистана 0,02 % на дифильной основе. Разработанный состав и технология позволили получить композицию, обладающую термостабильностью, приблизить водородный показатель мази к pH кожи человека. Вязкость мази с серпишеном находится в границах оптимума как гидрофильных, так и гидрофобных мазей.

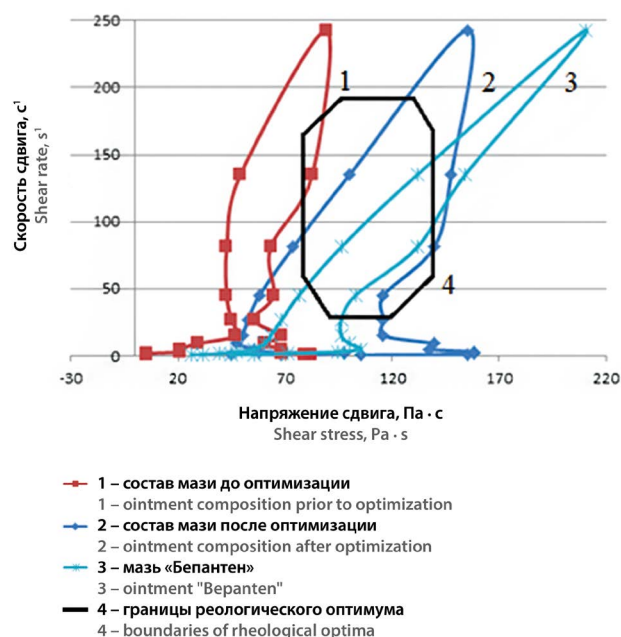


Рисунок 1. Реограммы течения мазевых композиций при 32 °С

Figure 1. Ointment composition flow rheograms at 32 °C

ЛИТЕРАТУРА

- Уфимцев К. Г., Ширшова Т. И., Володин В. В. Фитоэкдистероиды как детергенты насекомых-фитофагов: действие растения серпухи венценосной *Serratula coronata* – продуцента экдистероидов, на египетскую хлопковую совку *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Успехи современной биологии*. 2009;129(3):271–285.
- Володин В. В., Сидорова Ю. С., Мазо В. К. 20-гидроксизекдизон – растительный адаптоген: анаболическое действие, возможное использование в спортивном питании. *Вопросы питания*. 2013;82(6):24–30.
- Mamadaliyeva N. Z., El-Readi M. Z., Ovidi E., Ashour M. L., Hamoud R., Sagdullaev S. S., Azimova S. S., Tiezi A., Wink M. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phytopharmacology*. 2013;4(1):1–18.
- Радимич А. И., Шейченко В. И., Куляк О. Ю., Сайбель О. Л., Коротких И. Н. Изучение экдистероидов травы серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.). *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2020;4(30):34–42.
- Ханумиди Е. И. Биологически активные вещества серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) их использование и применение в медицине. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2017;20(7):3–7.
- Севостьянов А. Е., Соколов В. А., Дармограй В. Н. Перспективы применения фитоэкдистероидов в офтальмологии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. 2006;14(1):71–78.
- Володин В. В., Ву Тхи Лоан, Володина С. О., Кузнецов А. Н. Экдистероидсодержащие растения национального парка Кук Фьонг (Северный Вьетнам). *Известия Коми научного центра Уро РАН*. 2018;3(35):46–53.
- Николаева Г. Г., Шантанова Л. Н., Николаева И. Г., Раднаева Л. Д., Гармаева Л. Л., Цыбиктарова Л. П. Левзея одноцветковая и серпуха васильковая – перспективные экдистероидсодержащие растения. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2014;3(97):93–96.
- Оленников Д. Н., Кашенко Н. И. Фитоэкдистероиды родов *Serratula* L. и *Klasea* cass. (Asteraceae): хемотропное действие, методы выделения и анализа. *Химия растительного сырья*. 2017;4:123–135.

10. Оленников Д. Н., Кашченко Н. И. Фитоэксдистероиды надземной части *Serratula centauroides*, произрастающей в Прибайкалье. *Химия растительного сырья*. 2018;2:37–44.
11. Эрст А. А., Зибарева Л. Н., Железниченко Т. В., Ковзунова О. В. Культура генетически трансформированных корней (*hairy roots*) *Silene roemerii* Friv. – источник получения фитоэксдистероидов. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2017;37:17–30.
12. Володина С. О., Володин В. В., Чадин И. Ф. Ресурсы, биотехнология и использование эксдистероидсодержащих растений. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2010;12(1–3):668–674.
13. Быковский С. Н., Василенко И. А., Демина Н. Б., Шохин И. Е., Новожиллов О. В., Мешковский А. П., Спицкий О. Р., ред. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. М.: Перо; 2015. 472 с.
14. Молохова Е. И., Липин Д. Е., Володин В. В. Выбор композиции для ранозаживляющей мази на основе фитоэксдистероидов. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;1:1–6.
15. Молохова Е. И., Сорокина Ю. В. Сравнительное изучение реологических характеристик оригинального препарата Тридерм и его дженериков в форме крема. *Антибиотики и химиотерапия*. 2014;59(5–6):3–5.
- des growing in the Baikal region]. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja = Chemistry of plant raw materials*. 2018;2:37–44. (In Russ.)
11. Erst A. A., Zibareva L. N., Zheleznichenko T. V., Kovzunova O. V. Genetically transformed root cultures (*hairy roots*) of *Silene roemerii* Friv. as the source of phytoecdysteroids. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;37:17–30. (In Russ.)
12. Volodina S. O., Volodin V. V., Chadin I. F. Resources, biotechnology and utilization of the ecdysteroid-containing plants. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2010;12(1–3):668–674. (In Russ.)
13. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B., Shokhin I. E., Novozhilov O. V., Meshkovsky A. P., Spitsky O. R., editors. *Farmatsevticheskaya razrabotka: kontseptsii i prakticheskie rekomendatsii* [Pharmaceutical development: concept and practical guidelines]. Moscow: Pero; 2015. 472 p. (In Russ.)
14. Molokhova E. I., Lipin D. E., Volodin V. V. Composition choice for a wound healing ointment with phytoecdysteroids. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya*. 2014;1:1–6. (In Russ.)
15. Molokhova E. I., Sorokina Yu. V. Comparative Investigation of Rheological Characteristics of the Original Drug Triderm and its Generics in the Form of Cream. *Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2014;59(5–6):3–5. (In Russ.)

REFERENCES

1. Ufimtsev K. G., Shirshova T. I., Volodin V. V. Phytoecdysteroids as Deterrents of Insects-Phytophags: Effect of *Serratula coronata* on the Development of the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2009;129(3):271–285. (In Russ.)
2. Volodin V. V., Sidorova Yu. S., Mazo V. K. 20-hydroxyecdysone – plant adaptogen: an anabolic effect, possible use in sports nutrition. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2013;82(6):24–30. (In Russ.)
3. Mamadalieva N. Z., El-Readi M. Z., Ovidi E., Ashour M. L., Hamoud R., Sagdullaev S. S., Azimova S. S., Tiezi A., Wink M. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phytopharmacology*. 2013;4(1):1–18.
4. Radimich A. I., Sheychenko V. I., Kulyak O. Yu., Saibel O. L., Korotkich I. N. The investigation of ecdysteroids from *Serratula coronata* L. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv*. 2020;4(30):34–42. (In Russ.)
5. Khanumidi E. I. Biologically active substances of *Serratula coronata* L., their use and application in medicine. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2017;20(7):3–7. (In Russ.)
6. Sevostyanov A. E., Sokolov V. A., Darmograj V. N. Prospects of application phytoecdysteroids in ophthalmology. *Rossiyskiy medikobologicheskii vestnik imeni akademika I. P. Pavlova = Ryazan State Medical University named after academician I. P. Pavlov*. 2006;14(1):71–78. (In Russ.)
7. Volodin V. V., Vu Thi Loan, Volodina S. O., Kuznetsov A. N. Ecdysteroid-containing plants of the national park Cuc Phuong (Northern Vietnam). *Izvestiya Komi nauchnogo tsentra Uro RAN*. 2018;3(35):46–53. (In Russ.)
8. Nikolaeva G. G., Shantanova L. N., Nikolaeva I. G., Radnaeva L. D., Garmaeva L. L., Tsybiktartova L. P. *Rhaponticum uniflorum* (L.) and *Serratula centauroides* (L.) are promising ecdysteroid-containing plants. *Byulleten' VSNTs SO RAMN*. 2014;3(97):93–96. (In Russ.)
9. Olennikov D. N., Kashchenko N. I. *Fitoekdisteroidy rodov Serratula L. i Klasea cass. (Asteraceae): khemoraznoobrazie, metody vydeleniya i analiza* [Phytoecdysteroids of the genera *Serratula* L. and *Klasea* cass. (Asteraceae): chemical diversity, methods of isolation and analysis]. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja = Chemistry of plant raw materials*. 2017;4:123–135. (In Russ.)
10. Olennikov D. N., Kashchenko N. I. *Fitoekdisteroidy nadzemnoy chasti Serratula centauroides, proizrastayushchey v Priбайkal'e* [Phytoecdysteroids of the aboveground part of *Serratula centauroi-*

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116>
УДК 615.322; 66.084.8



Обзорная статья / Review article

Применение ультразвука в экстракции биологически активных соединений из растительного сырья, применяемого или перспективного для применения в медицине (обзор)

А. А. Елапов^{1*}, Н. Н. Кузнецов², А. И. Марахова¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (МГТУ им. Баумана), 105005, Россия, г. Москва, ул. 2-я Бауманская, д. 5, стр. 1

*Контактное лицо: Елапов Александр Александрович. E-mail: 1042190109@rudn.ru

ORCID: А. А. Елапов – <https://orcid.org/0000-0002-5960-3223>; Н. Н. Кузнецов – <https://orcid.org/0000-0002-3474-9234>; А. И. Марахова – <https://orcid.org/0000-0003-4442-9266>.

Статья поступила: 01.12.2020

Статья принята в печать: 11.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. В настоящем обзоре рассмотрено современное состояние технологий ультразвукового выделения биологически активных компонентов из лекарственного растительного сырья и растительного сырья для использования в медицинской и косметологической практике. Основной акцент сделан на «зеленые» технологии, интенсифицирующие процессы выделения таких компонентов, как флавоноиды.

Текст. Современные технологии подразумевают использование комбинированных методов, включающих помимо ультразвука существенное измельчение сырья перед процессом экстракции, применение сверхкритических растворителей (сжиженных газов) под избыточным давлением. Также было рассмотрено влияние мощности ультразвука и температуры на выход извлекаемых компонентов.

Заключение. 1. Для увеличения выхода биологически активных соединений из растительного сырья среди различных физических методов интенсификации экстракции, доминирует применение ультразвука. 2. Ультразвуковую экстракцию можно разделить на несколько основных типов: экстракция в ультразвуковой ванне, применение погружных ультразвуковых излучателей, а также совмещение ультразвуковой экстракции с дополнительными видами воздействия. 3. В литературных источниках наиболее полно представлены примеры использования ультразвуковой экстракции для выделения фенольных соединений, причем отмечено, что параметры необходимо подбирать индивидуально для каждого отдельного растительного объекта. 4. Мощность ультразвука и характер экстрагента могут влиять на протекания окислительных процессов в экстракте, причем такие явления характерны не только для слишком высоких мощностей, но и для низких. 5. Ультразвук может значительно повысить выход биологически активных соединений даже при водной экстракции свежего сырья. 6. Спектр выбора экстрагентов для проведения ультразвуковой экстракции растительного сырья достаточно велик. Могут применяться как органические растворители (этанол, метанол, этилацетат, ацетон), так и вода, а также смеси различных экстрагентов.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, ультразвук, мощность, температура, измельченность, избыточное давление, сверхкритическая экстракция

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

Вклад авторов. А. А. Елапов проводил поиск литературных данных. Н. Н. Кузнецов систематизировал литературные данные. А. И. Марахова систематизировала литературные данные, участвовала в оформлении статьи, формулировала заключение.

Благодарность. Исследование проводилось при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых – докторов наук МД-1730.2021.3. Публикация выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства РУДН.

Для цитирования: Елапов А. А., Кузнецов Н. Н., Марахова А. И. Применение ультразвука в экстракции биологически активных соединений из растительного сырья, применяемого или перспективного для применения в медицине. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):96–116. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116>

The Use of Ultrasound in the Extraction of Biologically Active Compounds from Plant Raw Materials, Used or promising for Use in Medicine (Review)

Alexander A. Elapov^{1*}, Nikolay N. Kuznetsov², Anna I. Marakhova¹

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

² Bauman Moscow State Technical University (BMSTU, Bauman MSTU), 5/1, 2nd Baumanskaya str., Moscow, 105005, Russia

*Corresponding author: Alexander A. Elapov. E-mail: 1042190109@rudn.ru

ORCID: Alexander A. Elapov – <https://orcid.org/0000-0002-5960-3223>; Nikolay N. Kuznetsov – <https://orcid.org/0000-0002-3474-9234>; Anna I. Marakhova – <https://orcid.org/0000-0003-4442-9266>.

Received: 01.12.2020

Revised: 11.10.2021

Published: 25.11.2021

© Елапов А. А., Кузнецов Н. Н., Марахова А. И., 2021

© Elapov A. A., Kuznetsov N. N., Marakhova A. I., 2021

Abstract

Introduction. This review examines the current state of technology for ultrasonic isolation of biologically active components from medicinal vegetal raw materials. The main emphasis is placed on "green" technologies that intensify the processes of isolation of components such as flavonoids.

Text. Modern technologies imply the use of combined methods, including, in addition to ultrasound, significant grinding of raw materials before the extraction process, the use of supercritical solvents (liquefied gases) under excessive pressure. The effect of ultrasound power and temperature on the output of the extracted components was also considered.

Conclusion. 1. To increase the yield of biologically active compounds from plant raw materials among various physical methods of extraction intensification, the use of ultrasound dominates. 2. Ultrasonic extraction can be divided into several main types: extraction in an ultrasonic bath, the use of submersible ultrasonic emitters, as well as the combination of ultrasonic extraction with additional types of influence. 3. In the literature, examples of the use of ultrasonic extraction for the isolation of phenolic compounds are most fully presented, it being noted that the parameters need to be selected individually for each individual plant. 4. The power of ultrasound and the nature of the extractant can affect the course of oxidative processes in the extract, and such phenomena are characteristic not only for too high capacities, but also for low ones. 5. Ultrasound can significantly increase the yield of biologically active compounds even in aqueous extraction of fresh raw materials. 6. The spectrum of extractants selection for ultrasonic extraction of plant raw materials is quite large. Both organic solvents (ethanol, methanol, ethyl acetate, acetone) and water can be used, as well as mixtures of various extractants.

Keywords: medicinal plant raw materials, ultrasound, power, temperature, grinding, overpressure, supercritical extraction

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

Contribution of the authors. Alexander A. Elapov searched for literature data. Nikolay N. Kuznetsov systematized literary data. Anna I. Marakhova systematized literary data, participated in the design of the article, wrote the conclusion.

Acknowledgment. The study was supported by the grant of the President of the Russian Federation for young scientists – doctors of science MD-1730.2021.3. This publication was supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

For citation: Elapov A. A., Kuznetsov N. N., Marakhova A. I. The use of ultrasound in the extraction of biologically active compounds from plant raw materials, used or promising for use in medicine. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):96–116. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116>

ВВЕДЕНИЕ

Современные технологии получения биологически активных соединений (БАС) из растительного сырья направлены на оптимизацию процессов экстракции, которая заключается в подборе условий для обеспечения большего выхода продукта, сокращении времени извлечения, снижения себестоимости продукта. Для этих целей часто применяются различные физические методы, такие как действие ультразвука, электрического поля (растворитель является диэлектриком), инфракрасного света (разогрев экстракционной смеси, более мягкий, чем при прямом нагреве), микроволнового излучения, а также экстракция под воздействием высокого давления (до 500 Мпа). Подобные технологии существенно увеличивают выход биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья (ЛРС), по сравнению с классическими методами экстракции [1].

В последнее время наблюдается большой интерес к использованию высокоэнергетических методов экстракции, которые включают микроволновую или ультразвуковую экстракцию для выделения природ-

ных биоактивных соединений из растительного лекарственного и пищевого сырья [2–5].

Внимание исследователей чаще всего сфокусировано на экстракции фенольных соединений в связи с их высокой и разнообразной фармакологической активностью, причем в подавляющем большинстве работ для повышения выхода и интенсификации процесса извлечения этой группы БАС применяется ультразвук [6–14].

Целью настоящей работы является информационно-аналитические исследования по применению ультразвука в экстракции биологически активных соединений из лекарственного растительного сырья.

Параметрами ультразвуковой экстракции, влияющими на выход полифенолов и антиоксидантную активность экстрактов, являются температура, частота и мощность ультразвука, а также время экстракции [3].

Критические параметры, оказывающие влияние на выход целевого продукта при воздействии ультразвука, приведены в таблице 1 [4].

Таблица 1. Параметры, влияющие на ультразвуковую экстракцию, и обоснование их значимости

Table 1. Parameters influencing on ultrasonic extraction and substantiation of their significance

Параметр Parameter	Обоснование Confirmation
Интенсивность ультразвука Ultrasound intensity	Порог кавитации требует минимальной интенсивности The cavitation threshold requires a minimum intensity
Давление парообразования экстрагента Vaporization pressure of the extractant	Летучие растворители снижают необходимую энергию и тем самым порог кавитации; кавитация в растворителях с очень низким давлением пара затруднена Volatile solvents reduce the required energy and the cavitation threshold; cavitation in solvents with very low vapor pressure is difficult
Температура Temperature	Повышение температуры увеличивает кавитацию, потому что давление пара увеличивается, однако при повышении температуры выше 50 °C внутри полости достигается более низкое давление, что может привести к снижению сонохимических эффектов Temperature rising increases cavitation, because the vapor pressure increases, however, when the temperature rises above 50 °C, a lower pressure is reached inside the cavity, which can lead to a decrease in sonochemical effects
Содержание газа в жидкой фазе экстрагента Gas content in the liquid phase of the extractant	Газ, действующий как кавитационные ядра, снижает порог кавитации, при этом моноатомные газы, такие как He, Ar, Ne, более эффективны, чем двухатомные газы, например N ₂ , O ₂ , воздух, в усилении кавитации Gas, acting as cavitation nuclei, lowers the threshold of cavitation, while monoatomic gases such as He, Ar, Ne are more effective than diatomic gases, such as N ₂ , O ₂ , air, in enhancing cavitation
Давление Pressure	В общем случае, если внешнее давление увеличивается, наблюдается более низкий порог кавитации In general, if the external pressure increases, a lower cavitation threshold is observed

Влияние ультразвука на процесс экстракции не ограничивается увеличением выхода целевого продукта, ультразвук также оказывает антисептическое действие и увеличивает срок хранения водных экстрактов. Отмечено, что существенно понижаются количества микроорганизмов группы кишечной палочки, группы сальмонелл, группы стрептококков, а также плесеней и дрожжевых грибов [5]. Проявление этих эффектов напрямую зависит от параметров проведения процесса экстракции: мощности ультразвука, времени воздействия и температуры.

В литературе имеются сравнительные данные двух способов экстракции «зеленой химии», а именно с применением ультразвука и микроволнового из-

лучения на примере корней девясила (*Inula helenium* L.) [6]. Определяли выход БАС при использовании в качестве экстрагентов 70%-го метанола, этанола и воды. В экстрактах установлено наличие углеводов (сахаров, фруктоолигосахаридов и инулина), суммы фенольных соединений и флавоноидов. Водные экстракты, полученные методом ультразвуковой экстракции, показали наибольшее содержание инулина (38 г на 100 г массы высушенного растительного материала). Было установлено, что наивысшей антиоксидантной активностью обладает 70%-й этанольный экстракт, полученный в опыте с ультразвуком. Причина этого, вероятно, связана с высоким содержанием суммы фенольных соединений в 70%-м этанольном экстракте, полученным с применением ультразвука. Так, было зафиксировано, что в извлечении доминируют хлорогеновая кислота (1,84 мг/г) и флавоноиды (кверцетин, кемпферол и катехины). Ультразвуковая экстракция оценивалась как перспективный подход для извлечения суммы БАС из корней девясила по сравнению с микроволновым облучением.

Также были изучены методы экстракции с помощью воздействия микроволн и ультразвука для извлечения природных фенольных соединений из отходов цедры лайма [7]. Для прогнозирования оптимальных условий каждого параметра экстракции на основе данных по общему содержанию соединений фенольной природы, антиоксидантной активности и полувинны максимальной ингибирующей концентрации, использовалась методология поверхности отклика с трехуровневой и трехфакторной конструкцией Бокса – Бенкена. Результаты исследования показали, что оптимальное содержание суммы фенольных соединений для микроволновой экстракции было получено при концентрации этанола 55 %, мощности микроволн 140 Вт в течение 45 с, кратность экстракции составила 8 раз. Между тем наибольшая сумма фенольных соединений при ультразвуковой экстракции отмечена при концентрации этанола 55 %, амплитуде ультразвука 38 % и времени экстракции 4 мин. Ультразвуковая экстракция показала себя как более эффективный метод для суммарного извлечения фенольных соединений с высокой антиоксидантной активностью и экономией времени экстракции на 33 % по сравнению с микроволновой экстракцией. Следовательно, ультразвуковая экстракция более предпочтительна для извлечения фенольных соединений из отходов цедры лайма.

Экстракция фенольного комплекса была исследована на примере ядер и обезжиренной шелухи семян подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) с использованием ультразвуковой и микроволновой экстракции. Состав полученных извлечений был изучен методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектором с электроспрейной ионизацией (UHPLC-ESI-MS). Авторами было рассмотрено влияние таких параметров, как природа растворителя,

объем растворителя, температура и время. Было показано, что высокоэнергетические методы экстракции позволили снизить расход растворителя и сократить время процесса, а выходы экстракции анализируемых веществ были равны или в некоторой степени выше, чем при использовании традиционных методов. Общее содержание полифенолов в полученных образцах изучали методом Фолина – Чокольтеу (Folin – Ciocalteu method) и результаты представляли в мкг-эквивалентах галловой кислоты по отношению к массе (г) сухого экстракта. Ядра семян подсолнечника оказались более богатыми фенольными соединениями по сравнению со жмыхом, для которого применение физических методов практически не приводило к повышению эффективности экстракции. Антиоксидантную активность образцов определяли спектрофотометрическим методом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила-радикала с использованием бутилированного гидрокситолуола в качестве эталона. Среди фенольных соединений шелухи и ядер жмыха доминировали фенолкарбоновые кислоты, главным образом хлорогеновая, кофейная, коричневая, 4-гидроксibenзойная и *п*-кумаровая кислоты.

В литературе представлено большое количество однофакторных экспериментов ультразвуковой экстракции, которые подтвердили влияние температуры экстракции на выход полифенолов. Отмечено влияние температуры на содержание антоцианов, флавоноидов и общее содержание фенольных соединений в экстрактах кожуры *Nephelium lappaceum*, полученных с использованием ультразвуковой экстракции. Результаты показали, что выход фенольных соединений увеличивался за счет увеличения пористости материала, сольватации и массопереноса при повышении температуры экстракции [8]. При этом повышенная температура снижает поверхностное натяжение и вязкость экстрактов, что также повышает выход экстракции. Однако многие фенольные соединения легко гидролизуются и окисляются при высоких температурах, особенно при продолжительной экстракции. Было показано, что общее содержание фенольных соединений в экстрактах снижается при температурах, превышающих 60 °C, вследствие окислительной деградации БАС.

При увеличении мощности ультразвука с 50 до 150 Вт усиливаются кавитационные эффекты при извлечении полифенолов из цедры плодов *Nephelium lappaceum* и виноградных косточек [9]. Выход полифенолов из растертых чайных листьев возрастал на 16,6 % с увеличением мощности с 25 до 125 Вт [10]. Экстракция фенольных соединений листьев *Acer truncatum* повышалась на 9,5 % при возрастании мощности со 150 до 240 Вт [11].

Однако повышение эффективности экстракции при высокой мощности ультразвука может сопровождаться образованием гидроксильных радикалов, ко-

торые вызывают окисление фенольных соединений, особенно в случае использования в качестве экстрагента воды [12]. Таким образом, можно сделать вывод, что для снижения деградации полифенолов необходимо ограничивать использование высокой мощности ультразвука.

Помимо мощности ультразвука, влияние на выход полифенолов оказывает и частота ультразвука. Было показано, что частота ультразвука напрямую связана с составом полифенолов и флавоноидов в экстрактах [13]. Согласно некоторым исследованиям, увеличение частоты ультразвука в пределах мощности ультразвукового диапазона 20–100 кГц приводило к увеличению выхода полифенолов. В эксперименте было также показано, что низкие частоты усиливают акустическую кавитацию, что приводит к значительным физико-химическим изменениям в материалах. Общее содержание БАС фенольной природы и антиоксидантная активность экстрактов персика и тыквы имели самые высокие показатели при частоте 37 кГц [14].

Другим фактором, влияющим на выход фенольных соединений, при ультразвуковой экстракции является выбор экстрагента, который зависит от его свойств: полярности, температуры плавления, температуры кипения, плотности, удельного веса, сродства к целевому компоненту, а также влияния активности экстрагируемого соединения. Отмечено, что в ряде случаев экстрагент может реагировать с выделяемыми соединениями. Биохимические и физико-химические свойства экстрагентов, используемых для ультразвуковой экстракции, определяют природу экстракционной среды и взаимодействуют с обрабатываемым материалом и экстрагируемыми соединениями, что может влиять на стабильность полифенолов и эффективность процесса выделения БАС [15].

Отмечено, что для ультразвуковой экстракции могут применяться комплексные экстрагенты, состоящие как из органической, так и из водной фаз в различных соотношениях [16]. Органические растворители, такие как этанол, метанол, ацетон и изопропанол, смешанные с различными пропорциями воды, широко используются для извлечения антиоксидантных комплексов из растительных источников с использованием ультразвуковой экстракции.

В некоторых исследованиях экстрагенты подкисляют, чтобы предотвратить окисление фенольных соединений [17]. При этом соотношение органический растворитель:вода определяется сродством экстрагируемых полифенолов к растворителям, т. е. чем полярнее целевое соединение, тем больше воды в смеси растворителей.

Сравнение современных (ультразвуковая экстракция, СВЧ-экстракция и ускоренная экстракция) и традиционных (мацерация и в аппарате Сокслета) методов экстракции приводится на примере *Tanacetum*

parthenium (L.) Sch.Bip. [18]. Авторы определяли химический профиль экстрактов растения методом жидкостной хроматографии сверхвысокого давления – tandemной масс-спектрометрии (UHPLC-MS/MS). В экстрактах было установлено наличие шестидесяти различных фенольных соединений, относящихся к классам фенольных кислот, флавоноидных гликозидов и флавоноидных агликонов. Кроме того, 17 компонентов были определены количественно с использованием соответствующих стандартов, и было установлено, что современная экстракция способствует более высокому выходу фенольных соединений в сравнении со всеми изученными традиционными методами. Оценка антиоксидантной активности экстрактов проводилась *in vitro* с помощью пяти стандартных методик. Антиоксидантная активность преобладала в экстрактах, полученных современными методами, что связано с высоким содержанием галловой кислоты (0,27 мг/г экстракта) и флавоноидов в пересчете на рутин (0,52 мг/г экстракта). Экстракты *Tanacetum parthenium* также показали значительную ингибирующую активность α -глюкозидазы (1,63–1,67 ммоль эквивалента акарбозы / г экстракта) и умеренную ингибирующую активность в отношении α -амилазы (0,51–0,56 ммоль/г экстракта). Также была показана высокая активность экстрактов в отношении холинэстераз и тирозиназ. Параметры ультразвуковой экстракции, используемые авторами, следующие: экстрагент – 96%-й этанол, соотношение сырья и экстрагента 1:20; экстракция проводилась в ультразвуковой ванне в течении 1 часа при 30 °С. Отмечено, что извлечения *Tanacetum parthenium*, полученные таким способом, могут рассматриваться в качестве компонентов новых лекарственных препаратов.

Существенный объем информации по применению ультразвуковой экстракции представлен в патентных документах, опубликованных как в России, так и за ее пределами.

Так, в патенте М.Г. Сульмана [19] предложен способ экстракции из сухого растительного сырья, в котором авторы зафиксировали параметры проведения процесса: экстрагент этанол, частота ультразвука 22 кГц, интенсивность ультразвукового воздействия от 12 до 70 Вт/см², время воздействия от 180 до 420 с. Объектом исследования были: листья и корни женьшеня, цветки и плоды боярышника, трава зверобоя и трава пустырника. Отмечено, что данные условия повышают выход полисахаридов в 1,5–2 раза по сравнению с экстракцией без ультразвука. Однако не ясно, может ли ультразвук повлиять на растворимость полисахаридов в крепких спиртах, так как авторы не указывают изучаемый диапазон концентраций спирта.

Известен также способ получения водорастворимого экстракта из растительного сырья с применением ультразвуковой экстракции, отличающийся тем,

что измельчение и экстракцию осуществляют в диапазоне частот $22 \pm 1,65$ кГц и интенсивности ультразвука от 4 до 10 Вт/см² [20], в одном реакторе с последующим отделением жидкого экстракта от балластных веществ центрифугированием.

Также интерес представляет способ выделения пектиновых веществ в нативном состоянии из плодовых оболочек шиповника [21]. Процесс экстракции включает следующие стадии: предварительное замачивание измельченных (размер частиц 2,0 мм) плодовых оболочек шиповника водой в течение одного часа при температуре 20 °С; экстрагирование под действием ультразвука частотой 22 кГц, мощностью 20 Вт при плотности энергии 0,2 Вт/см³ в течение 10 минут. Температуру в процессе ультразвуковой экстракции не контролировали.

Отдельный интерес представляет ультразвуковая экстракция биологически активных веществ сжиженными газами [22]. Сконструирована специальная установка для экстракции биологического сырья сжиженными газами, которая содержит замкнутый контур, включающий испаритель, ресивер, конденсатор, экстрактор, снабженный системой подачи и вывода сырья, сборник экстракта, средства для подпитки экстрагента, измерительную и запорно-регулирующую арматуру. При этом на наружной поверхности цилиндра экстрактора размещены электронагреватель, ультразвуковые излучатели для интенсификации экстрагирования и оптроны для контроля уровня сырья в рабочем объеме экстрактора. Недостатком такой реализации применения ультразвука является специфика экстрагента, в частности применение углекислого газа позволяет извлекать больше жирорастворимых веществ (неполярных агликонов различных классов) и практически не извлекает гидрофильную фракцию. В этом случае извлечение не соответствует требованиям фармакопейных статей к настойкам и экстрактам ЛРС.

В литературе описаны примеры извлечения комплекса БАС методами многократной двухфазной экстракции в комплексе с ультразвуковой экстракцией. Отмечено, что биохимическая активность исследованных экстрактов БАС достигает максимального значения при УЗ обработке в течение 7–10 мин. При более длительной УЗ обработке происходит уменьшение количества антиоксидантов в экстракте возможно из-за частичной деструкции БАС. Использование ультразвука приводит к увеличению содержания суммы антиоксидантов в растительных экстрактах и тем самым повышает эффективность процесса экстракции. Полученные таким образом экстракты стабильны и сохраняют свои антиокислительные свойства в течение длительного времени (более 60 суток) [23].

Обобщенные данные по применению ультразвука в экстракции БАС из растительного сырья представлены в таблице 2 [2, 23–66].

Таблица 2. Области применения и особенности ультразвуковой экстракции БАС из растительного сырья
Table 2. Fields of application and features of BAS ultrasonic extraction from plant raw materials

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Полифенольные соединения с антиоксидантной активностью Polyphenolic compounds with antioxidant activity	Кора дуба (<i>Cortex Quercus</i>), почки березы (<i>Gemmae Betulae</i>) Oak bark (<i>Cortex Quercus</i>), birch buds (<i>Gemmae Betulae</i>)	Многократная двухфазная экстракция с ультразвуковой обработкой (с частотами $2 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$) мощностью 80 Вт Multiple two-phase extraction with ultrasonic processing (with frequencies $2 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$) with a power of 80 W	Повышение антиоксидантной активности экстрактов; сохранение стабильности в течение 60 суток Increasing the antioxidant activity of extracts; maintaining stability for 60 days	[23]
Флавоноиды Flavonoids	Плоды боярышника (<i>Fructus Crataegi</i>) Hawthorn fruit (<i>Fructus Crataegi</i>)	Измучатель цилиндрический волновод Cylindrical waveguide emitter	Улучшение экстракции на 23,3 % по сравнению с перколяцией Improvement in extraction over percolation on 23.3 %	[24]
Гинсенозиды Ginsenosides	Корень женьшеня (<i>Panax ginseng radices</i>) Ginseng Root (<i>Panax ginseng radices</i>)	Измучатель цилиндрический волновод Cylindrical waveguide emitter	Выход гинсенозидов составил от 80 до 110 %. Показано отсутствие разрушения структуры данных веществ при проведении экстракции The yield of ginsenosides was from 80 to 110 %. The absence of destruction of the structure of these substances during extraction was shown	[25]
Флавоноиды Flavonoids	Плоды черники (<i>Fructus Myrtilli</i>) Blueberry fruit (<i>Fructus Myrtilli</i>)	Измучатель цилиндрический волновод Cylindrical waveguide emitter	Эффективность экстракции повышалась ~ в 1,2 раза Extraction efficiency increased ~ in 1.2 times	[26]
Фенолы, флавоноиды Phenols, flavonoids	Косточки винограда (<i>Semina Vitidis iniferae</i>) Grape seeds (<i>Semina Vitidis iniferae</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Эффективность экстракции повышалась ~ в 1,2 раза Extraction efficiency increased ~ in 1.2 times	[27]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Фенолы, флавоноиды Phenols, flavonoids	Плоды рябины черноплодной (<i>Fructus Aroniae melanocarpa</i>) измельченные Chokeberry fruits (<i>Fructus Aroniae melanocarpa</i>), minced	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Масса навески 2 г, экстрагент спирт этиловый 98 %, разбавленный водой в соотношении 1:1; время экстракции 2 ч, частота ультразвука 35 кГц, температура $35 \pm 1^\circ\text{C}$ Raw material mass is 2 g, extractant is ethyl alcohol with concentration of 98 %, diluted with water in a ratio of 1:1; time of extraction is 2 h, ultrasonic frequency is 35 kHz, temperature is $35 \pm 1^\circ\text{C}$.	Применение ультразвуковой экстракции приводит к увеличению антиоксидантной активности экстракта. Увеличение эффективности экстракции ~ в 1,5 раза The use of ultrasonic extraction leads to an increase in the antioxidant activity of the extract. Extraction efficiency increased ~ in 1.5 times [28]
Флавоноиды Flavonoids	Трава гречихи (<i>herba Fagopyri esculenti</i>) Buckwheat herb (<i>Herba Fagopyri esculenti</i>)	Излучатель цилиндрический волновод Cylindrical waveguide emitter	Масса навески 1 г, размер частиц 1–2 мм, экстрагент спирт этиловый, время экстракции 120–150 с, частота ультразвука 22 кГц Raw material mass is 1 g, grinded to a particle size of 1–2 mm, extractant is ethyl alcohol, extraction time is 120–150 s, ultrasonic frequency is 22 kHz	Выход флавоноидов повышается в 1,5–3 раза Flavonoid yield increases in 1.5–3 times [29]
Флавоноиды, экстрактивные вещества Flavonoids, extractives	Семена пажитника сеного (<i>Semina Trigonellae foenum</i>) Fenugreek seeds (<i>Semina Trigonellae foenum</i>)	Излучатель цилиндрический волновод Cylindrical waveguide emitter	Навеска сырья 10 г, экстрагент вода очищенная или растворы спирта этилового с концентрацией 40–90 %, соотношение сырья:экстрагент (1:10), частота ультразвука 17–22 кГц, время 30–60 мин Raw material mass is 10 g, extractant is purified water or ethyl alcohol solutions with a concentration of 40–90 %, the ratio of raw materials:extractant is 1:10, ultrasonic frequency is 17–22 kHz, extraction time is 30–60 minutes	Ультразвуковая экстракция при воздействии в течение 60 мин позволяет получить большее количество экстрактивных веществ по сравнению с динамической мацерацией Ultrasonic extraction with exposure for 60 minutes allows to isolate a larger amount of extractives in comparison with dynamic maceration [30]
Флавоноиды, экстрактивные вещества Flavonoids, extractives	Семена пажитника сеного (<i>Semina Trigonellae foenum</i>) Fenugreek seeds (<i>Semina Trigonellae foenum</i>)	Излучатель цилиндрический волновод Cylindrical waveguide emitter	Навеска сырья 10 г, экстрагент вода очищенная или растворы спирта этилового с концентрацией 40–90 %, соотношение сырья:экстрагент (1:20), частота ультразвука 17–22 кГц, время экстракции 30–60 мин Raw material mass is 10 g, extractant is a purified water or ethyl alcohol solutions with a concentration of 40–90 %, the ratio of raw materials:extractant is 1:20, ultrasonic frequency is 17–22 kHz, extraction time is 30–60 minutes	Увеличение выхода экстрактивных веществ Increase in the yield of extractive substances [31]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Флаволигнаны Flavolignans	Плоды расторопши пятнистой (<i>Fructus Silybi mariani</i>) Milk thistle fruit (<i>Fructus Silybi mariani</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Обработка измельченных плодов расторопши пятнистой ультразвуком на стадии намачивания, практически вдвое повышает выход флаволигнанового комплекса из лекарственного растительного сырья The treatment of grinded <i>Silybi mariani fructus</i> with ultrasound at the stage of moistening practically doubles the yield of the flavolignan complex from herbal raw material	[32]
Капсаицин Capsaicin	Плоды острого перца (<i>Fructus Capsicum annuum</i>) Hot Pepper Fruit (<i>Fructus Capsicum annuum</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Сокращение времени экстракции в 2 раза, выход капсаицина более 99 % Reduction of the extraction time by 2 times, the capsaicin yield is more than 99 %	[33]
Авенантрамиды Avenanthramides	Плоды овса посевного (<i>Fructus Avena sativa</i>) Sowing oat fruit (<i>Fructus Avena sativa</i>)	Ультразвуковой технологический аппарат серии «Волна-М» Ultrasonic technological device "Volna-M" series	Увеличение выхода экстрактивных веществ и повышение антиоксидантной активности Increased the yield of extractive substances and increased the antioxidant activity of extract	[34]
Флавоноиды Flavonoids	Цветки ромашки аптечной (<i>Flores Chamomilla recutita</i>) Chamomile flowers (<i>flores Chamomilla recutita</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Повышение выхода суммы флавоноидов до 97 % (на 35–45 %), эфирного масла – до 81 % Increasing the yield of the sum of flavonoids up to 97 % (by 35–45 %), essential oil – up to 81 %	[35]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды Phenol carboxylic acids, flavonoids	Трава зверобоя продырявленного (Herba Hyperici perforati) St. John's wort (Herba Hyperici perforati)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	При данных условиях ультразвук не повышает выход биологически активных соединений из данного лекарственного растительного сырья Under these conditions, ultrasound does not increase the yield of biologically active substances from this herbal raw material	[36]
Дубильные вещества, флавоноиды Tannins, flavonoids	Трава василька синего (Herba Centaureae cyanus) Blue cornflower herb (Herba Centaureae cyanus)	Экспериментальная ультразвуковая установка с погружным излучателем «грибового» типа, работающий на частоте ультразвука 22–23 кГц с поддержанием температуры на уровне Experimental ultrasonic installation with a submersible «fun-gal» type transducer, operating at an ultrasound frequency of 22–23 kHz with maintaining the temperature at a constant level	Повышение экстракции дубильных веществ и флавоноидов в среднем в 1,5 раза по сравнению с контрольным опытом An increase in the extraction of tannins and flavonoids by an average of 1.5 times compared with the control experiment	[37]
Фенольные соединения Phenolic compounds	Семена персеи американской (Semina Persea americana) American Perseus seeds (Semina Persea americana)	Ультразвуковая ванна, 40 кГц, 130 Вт Ultrasonic bath, 40 kHz, 130 W	Увеличение выхода суммы фенольных соединений, повышение антиоксидантной активности экстрактов Increasing the yield of the sum of phenolic compounds, increasing the antioxidant activity of extracts	[39]
Фенольные соединения, в т. ч. галловая кислота Phenolic compounds, incl. gallic acid	Листья филлантуса горького (Folia Phyllanthus amari) Leaves of phyllanthus bitter (Folia Phyllanthus amari)	Погружной излучатель (13 мм диаметром), 500 Вт Immersion emitter (13 mm diameter), 500 W	Повышение экстракции фенольных соединений при 226 Вт/см ² в течение 5 мин, в том числе галловой кислоты в течение 3 мин Increased extraction of phenolic compounds at 226 W/cm ² for 5 minutes, including gallic acid after 3 minutes	[40]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Фенольные соединения Phenolic compounds	Плоды оливы европейской (<i>Fructus Olea europaea</i>) European olives (<i>Fructus Olea europaea</i>)	Погружной излучатель (2,2 см диаметр), 400 Вт Submersible emitter (2.2 cm dia.), 400 W	Увеличение выхода фенольных соединений, в том числе олеуропеина и гидроксицитрозола Increased yield of phenolic compounds, including oleuropein and hydroxytyrosol	[42]
Фенольные соединения Phenolic compounds	Околоплодник гранатника сорта Малас (<i>Pericarpium externum Malum punicum</i>) Pericarp pomegranate variety Malas (<i>pericarpium externum Malum punicum</i>)	Погружной излучатель, (площадь излучателя 1,53 см ²), интенсивность до 105 Вт/см ² , 24 кГц Submersible emitter, (emitter area 1.53 cm ²), intensity up to 105 W/cm ² , 24 kHz	Повышение антиоксидантной активности экстракта Increasing the antioxidant activity of the extract	[43]
γ-гидрокси-5,6,7,4'-тетраметоксифлавоны и синенсетин γ-hydroxy-5,6,7,4'-tetra-methoxyflavone and sinensetin	Листья ортосифона тычиночного (<i>Folia Orthosiphoni staminei</i>) Orthosiphon stamineate leaves (<i>Folia Orthosiphoni staminei</i>)	Погружной излучатель (25 мм диаметр), 20 кГц, 500 Вт Submersible emitter (25 mm diameter), 20 kHz, 500 W	Увеличение выхода биологически активных веществ в сравнении с экстракцией в поле микроволн Increased yield of biologically active substances in comparison with extraction in a microwave field	[44]
Экстрактивные вещества Extractive substances	Листья лука медвежьего (<i>Folia Allium ursinum</i>) Bear onion leaves (<i>folia Allium ursinum</i>)	Ультразвуковая ванна, 40 кГц Ultrasonic bath, 40 kHz	Увеличение выхода суммы фенолов, флавоноидов и антиоксидантной активности Increasing the yield of flavonoids, phenols and antioxidant activity	[45]
Моно- и олигосахариды Mono- and oligosaccharides	Цветки ромашки аптечной (<i>Flores Matricaria chamomilla</i>) Chamomile flowers (<i>flores Matricaria chamomilla</i>)	Ультразвуковая ванна, 40 мин Ultrasonic bath, 40 min	Увеличение выхода сахаров Increasing of sugar yield	[46]

Продолжение таблицы 2

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Полифенолы Polyphenols	Плоды рамбутана (<i>Fructus Nephelium lappaceum</i>), семена винограда (<i>Semen Vitis vinifera</i>) Rambutan Fruit (<i>Fructus Nephelium lappaceum</i>), Grape Seed (<i>Semen Vitis vinifera</i>)	Ультразвук. Частота 20 кГц – 1 МГц; подводимая мощность < 100 мВт/см ² ; температура 20–50 °С Frequency 20 kHz – 1 MHz; input power < 100 mW/cm ² ; temperature 20–50 °C Мощность ультразвука 50–150 Вт, частота 20–100 кГц, экстрагент спирт метиловый, спирт этиловый, ацетон, время воздействия 30 мин Ultrasound power is 50–150 W, frequency is 20–100 kHz, extractants are methyl alcohol, ethyl alcohol, acetone, exposure time during 30 min	Ультразвуковая экстракция не только способствует увеличению выхода полифенолов при экстракции, но также лучше сохраняет и увеличивает биологическую активность экстрактов полифенолов по сравнению с традиционной мацерацией и экстракцией Сокслета. Ultrasound extraction not only helps to increase the yield of polyphenols during extraction, but also preserves and increases the biological activity of polyphenol extracts better than traditional maceration and extraction in Soxhlet device.	[47]
Полифенолы, гликозиды и агликаны Polyphenols, glycosides and aglycones	Трава бодяка разнолистного (<i>Herba Cirsium heterophyllum</i>) Herba Cirsium heterophyllum	Ультразвуковая ванна Ultrasoundic bath Масса сухого образца 2 г (размер частиц 1 мм), экстрагент – спирт метиловый или вода объемом 50 мл, время экстракции 1 час, температура 30 °С Raw material mass is 2 g drinded to a particle size of 1 mm, extractant is methyl alcohol or water with a volume of 50 ml, time of extraction is 1 hour, temperature is 30 °C	Ультразвуковой экстракт показал высокую активность в ингибировании бутрилхолинэстеразы и тирозиназы, но низкую по отношению к амилазе и α-глюкозидазе Ultrasoundic extract showed high activity in inhibiting butyrylcholinesterase and tyrosinase, but low activity in relation to amylase and α-glucosidase	[48]
Полифенольные соединения Polyphenolic compounds	Цветки пижмы девичьей (<i>Flores Tanacetii parthenium</i>) Flowers of maiden tansy (<i>Flores Tanacetii parthenium</i>)	Ультразвуковая ванна (для сравнения экстракция в присутствии ацетилхолин эстеразы) Ultrasoundic bath (for comparison, extraction in the presence of acetylcholine esterase) Масса образца 1 г, температура 30 °С, экстрагент – спирт этиловый. Raw material mass is 1 g, temperature of extraction is 30 °C, extractant is ethyl alcohol	Получение экстрактов с повышенной антиоксидантной активностью и высоким содержанием суммы фенолов в пересчете на галловую кислоту и флавоноидов в пересчете на рутин; значительная ингибирующая УЗ экстрактов на активность альфа-глюкозидазы [и умеренную ингибирующую активность против α-амилазы (0,51–0,56 ммоль САЕ/г экстракта)] Obtaining extracts with increased antioxidant activity and a high content of the sum of phenols in terms of gallic acid and flavonoids in terms of rutin; significant inhibitory ultrasound extracts on the activity of alpha-glucosidase and moderate inhibitory activity against α-amylase (0.51–0.56 mmol CAE/g extract)	[49]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Полифенольные соединения Polyphenolic compounds	Семена подсолнечника (<i>Semina Helianthus annui</i>) Sunflower seeds (<i>Semina Helianthus annui</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Увеличение антиоксидантной активности экстракта Increasing of antioxidant activity of the extract	[50]
Полисахариды Polysaccharides	Листья мяты канадской (<i>Folia Menthæ canadensis</i>) Canadian mint leaves (<i>Folia Menthæ canadensis</i>)	Экстракция ультразвуком (погружной щуп) под высоким давлением Ultrasonic extraction (immersion probe) under high pressure	Увеличение антиоксидантной активности экстракта Increasing of antioxidant activity of the extract	[51]
Полифенольные соединения (гликозиды и агликоны) Polyphenolic compounds (glycosides and aglycones)	Цветки астры ланцетной (<i>Flores Aster lanceolati</i>) Aster flowers lanceolate (<i>Flores Aster lanceolati</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Получение экстрактов с более эффективным антибактериальным и антипролиферативным действием Obtaining extracts with more effective antibacterial and anti-proliferative action	[52]
Экстрактивные вещества Extractive substances	Семена льна (<i>Semina Lini</i>) Flax Seeds (<i>Semina Lini</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Экстракт, полученный при сочетании ультразвука и воздействия ферментов оказался практически идентичный по количеству экстрактивных веществ в сравнении с экстрактом, полученным при ферментативном гидролизе. Таким образом, ферментативный гидролиз более эффективен по сравнению с УЗ воздействием для экстракции БАС из семян льна The extract obtained by the combination of ultrasound and the action of enzymes turned out to be practically identical in the amount of extractive substances in comparison with the extract obtained by enzymatic hydrolysis. Thus, enzymatic hydrolysis is more effective in comparison with ultrasound treatment for the extraction of BAS from flax seeds	[53]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Полифенольные соединения Polyphenolic compounds	Шрот цедры лайма (<i>Citrus aurantiifolia</i>) Lime peel meal (<i>Citrus aurantiifolia</i>)	Погружной излучатель, диаметр 3 мм для малых объемов Immersion radiator, diameter 3 mm for small volumes.	Увеличение выхода полифенольных соединений и антиоксидантной активности Increasing the yield of polyphenolic compounds and antioxidant activity	[54]
Сесквитерпен α -бисаболол Sesquiterpene α -bisabolol	Кора кандеи (<i>Cortex Eremanthis erythrorappi</i>) Kandea bark (<i>Cortex Eremanthis erythrorappi</i>)	Погружной титановый излучатель, 13 мм, ячейка 250 мл в термостатируемой ванне Immersion titanium emitter, 13 mm, 250 ml cell in thermostatic bath	Сокращение времени экстракции в 2,5 раза и увеличение выхода α -бисаболола по сравнению с использованием аппарата Сокслета Reduction of the extraction time by 2.5 times and an increase in the yield of α -bisabolol in comparison with extraction, using Soxhlet device	[55]
Экстрактивные вещества Extractive substances	Окопник гранатника (<i>Pericarpium externum Malum Punicum</i>), шрот гранатника (<i>Punica granatum</i>) Pomegranate pericarp (<i>pericarpium externum Malum Punicum</i>), pomegranate meal (<i>Punica granatum</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Получение экстракта с повышенной противогрибковой активностью в отношении <i>Aspergillus niger</i> Obtaining an extract with increased antifungal activity against <i>Aspergillus niger</i>	[56]
Экстрактивные вещества Extractive substances	Цветки ромашки пахучей (<i>Flores Anthemis cotula</i>) Chamomile flowers (<i>Flores Anthemis cotula</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Увеличение выхода сесквитерпенов и полифенолов Increasing the yield of sesquiterpenes and polyphenols	[57]
Фенольные соединения Phenolic compounds	Кора березы (<i>Cortex Betula</i>) Birch bark (<i>Cortex Betula</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Увеличение выхода фенольных соединений Increased yield of phenolic compounds	[58]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Полисахариды (инулин и производные) Polysaccharides (inulin and derivatives)	Плоды пастернака посевного (<i>Fructus Pastinacae sativae</i>) Parsnips (<i>Fructus Pastinacae sativae</i>)	Погружной титановый излучатель Submersible titanium emitter	Образец: измельченное, высушенное сырье. Ультразвук: амплитуда 70 %, время экстракции 5, 10 и 15 мин, мощность 150 Вт, частота 40 кГц Sample: grinded dried raw material. Ultrasound: amplitude is 70 %, extraction time is 5, 10 and 15 minutes, power is 150 W, frequency is 40 kHz	Увеличение выхода инулина и полифенолов в экстракте, полученном при ферментативной обработке в сочетании с ферментативным гидролизом Increasing in the yield of inulin and polyphenols in the extract obtained by enzymatic treatment in combination with enzymatic hydrolysis [59]
Эфирные масла Essential oils	Листья шалфея обыкновенного (<i>Folia Salviae officinalis</i>), корневища с корнями валерианы лекарственной (<i>Rhizomata cum radicibus Valerianae</i>) Leaves of common sage (<i>Folia Salviae officinalis</i>), rhizomes with roots of Valerian officinalis (<i>Rhizomata cum radicibus Valerianae</i>)	Погружной излучатель Immersion emitter	Образец: измельченное высушенное сырье; экстрагент – 60%-й спирт этиловый. Соотношение сырье:экстрагент (1:5; 1:6). Ультразвук: мощность 600 Вт, частота 20 кГц в импульсном и непрерывном режимах. Время экстракции от 1 ч до 4 дней Sample: grinded dried raw materials; extractant is ethyl alcohol with concentration of 60 %. The ratio of raw materials: extractant is 1:5; 1:6. Ultrasound: power is 600 W, frequency is 20 kHz in pulsed and continuous modes. The extraction time is from 1 hour to 4 days	Обработка ультразвуком в непрерывном режиме в течение длительного времени приводит к разложению БАС. Кратковременная импульсная обработка приводит к увеличению выхода компонентов эфирного масла валерианы и шалфея, причем для листьев шалфея ультразвуковая экстракция более эффективна Continuous sonication for a long time leads to the destruction of BAS. Short-term pulse treatment leads to an increase in the yield of the essential oil components of <i>Valeriana officinalis</i> and <i>Salvia officinalis</i> , and ultrasonic extraction is more effective for <i>Salvia officinalis</i> [60]
Полисахариды Polysaccharides	Корневища с корнями валерианы лекарственной (<i>Rhizomata cum radicibus Valerianae officinalis</i>) Rhizomes with roots of Valerian officinalis (<i>Rhizomata cum radicibus Valerianae officinalis</i>)	Погружной излучатель Immersion emitter	Образец: измельченное до размера частиц 2–3 мм высушенное сырье; экстрагент – 60%-й спирт этиловый. Соотношение сырье:экстрагент (1:6; 7). Ультразвук: мощность 600 Вт, частота 20 кГц. Время экстракции по 2 часа в день; продолжительность 3 дня. Sample: dried raw material grinded to a particle size of 2–3 mm; extractant is ethyl alcohol with concentration of 60 %. Raw material: extractant ratio is 1:6; 7. Ultrasound: power is 600 W, frequency is 20 kHz. Extraction time 2 hours every day; duration 3 days	Увеличение выхода пектиновых веществ, ксилана, маннана и глюкана по сравнению с экстракцией горячей водой. Выход суммарной полисахаридов при ультразвуковой обработке был ниже, чем при экстракции горячей водой Increasing the yield of pectin, xylan, mannan and glucan compared to hot water extraction. The yield of the sum of polysaccharides during ultrasonic treatment was lower than during extraction with hot water [61]

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field	Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Полисахариды Polysaccharides	Побеги древовидного пиона (<i>Cornus Paconia arborescens</i>) Shoots of tree peony (<i>Cornus Paconia arborescens</i>)	Ультразвуковая ванна Ultrasonic bath	Выход полисахаридов составил 14,14 ± 0,44 % The polysaccharide yield was 14,14 ± 0,44 % [62]	
Жирные кислоты, фенольные соединения Fatty acids, phenolic compounds	Семена восковой тыквы (<i>Semina Benincasa hispida</i>) Seeds of wax gourd (<i>Semina Benincasa hispida</i>)	Погружной титановый излучатель Submersible titanium emitter	Наилучшие результаты получены при использовании ультразвука мощностью 65 % от максимальной в течение 36 мин при 52 °С. Ультразвук не увеличивал суммарный выход экстракта, однако повышал выход фенолов, жирных кислот и антиоксидантную активность экстракта The best results were obtained when using ultrasound with a power of 65 % of the maximum for 36 minutes at 52 °C. Ultrasound did not increase the total yield of the extract, but increase the yield of phenols, fatty acids and the antioxidant activity of the extract [63]	
Сапонины Saponins	Листья квиллайи мыльной (Folia <i>Quillaja saponaria</i> Molina) Quillaya leaves soap (Folia <i>Quillaja saponaria</i> Molina)	Погружной титановый излучатель Submersible titanium emitter	Ультразвук улучшает экстракцию сапонинов. Статистически значимыми переменными, которые влияют на процесс ультразвуковой экстракции, являясь: измельченность (opt 0,2 мм), соотношение сырье:экстракт (opt 1:15) и время обработки (opt 30 мин) Ultrasound improves the extraction of saponins. The statistically significant variables that affect the ultrasonic extraction process are: fineness (opt 0.2 mm), the ratio of raw materials:extractant (opt 1:15) and processing time (opt 30 min) [64]	

Биологически активные соединения Biologically active compounds	Исходный материал Raw material	Условия экстракции в поле ультразвука Extraction conditions in the ultrasound field		Достижимый результат Achieved result	Источник A Source
Эфирное масло Essential oils	Листья мяты колосистой (<i>Folia Menta spicata</i>) Mint leaves (<i>Folia Menta spicata</i>)	Погружной излучатель Immersion emitter	Образец: высушенные, измельченные листья мяты, экстрагент – спирт этиловый; соотношение сырье:экстрагент (1:24). Ультразвук: мощность 380 Вт, время экстракции 51 мин Sample: dried grinded mint leaves, extractant is ethyl alcohol; the ratio of raw material:extractant is 1:24. Ultrasound: power is 380 W, extraction time is 51 min	Выход карвона и лимонена составил 19,958 и 5,957 мг/г соответственно The yield of carvone and limonene was 19.958 and 5.957 mg/g, respectively [65]	
Экстрактивные вещества Extractive substances	Семена томата Tomato seeds	Цилиндрическая ультразвуковая ванна Cylindrical ultrasonic cleaner	Образец: измельченные семена томатов, экстрагент – вода дистиллированная, нагретая до 30–35 °С, соотношение сырье:экстрагент (1:3). Ультразвук: частота 17–44 кГц, время экстракции 60 минут Sample: crushed tomato seeds, extractant: distilled water heated to 30–35 °C, the ratio of raw materials:extractant (1:3). Ultrasound: frequency 17–44 kHz, extraction time 60 minutes	Продолжительность экстракции БАВ сокращается более чем в 8–9 раз, температура снижается с 90 до 25–30 °С. При продолжительности обработки более 60 минут наблюдается снижение массы БАВ The duration of the extraction of biologically active substances is reduced by more than 8–9 times, the temperature decreases from 90 to 25–30 °C. With a treatment duration of more than 60 minutes, a decrease in the mass of biologically active substances is observed [66]	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Для увеличения выхода биологически активных соединений из растительного сырья среди различных физических методов интенсификации экстракции доминирует применение ультразвука.
2. Ультразвуковую экстракцию можно разделить на несколько основных типов: экстракция в ультразвуковой ванне, применение погружных ультразвуковых излучателей, а также совмещение ультразвуковой экстракции с дополнительными видами воздействия. Из анализа литературных данных следует, что большинство авторов преследуют цель повысить экстракцию фенольных соединений и получить экстракты с высокой антиоксидантной активностью. Однако имеются данные по увеличению выхода моно- и полисахаридов, эфирного масла и индивидуальных биологически активных веществ. Также экстракты, полученные с применением ультразвука, способны ингибировать активность ряда гидролитических ферментов, а также они сохраняют свою стабильность более длительное время, в том числе и за счет снижения общей микробной обсемененности растительных объектов.
3. Анализ литературы показал, что варьируя параметрами ультразвуковой экстракции, такими как частота, мощность и амплитуда ультразвукового воздействия, характер растворителя, время экстракции, становится возможным выделять те или иные компоненты и получать экстракты с улучшенными антиоксидантными и другими свойствами. Таким образом, систематические исследования по влиянию различных параметров ультразвука могут явиться предпосылкой для фракционного выделения отдельных групп биологически активных веществ. Однако для каждого индивидуального случая необходимо подбирать параметры ультразвукового воздействия, чтобы добиться необходимого эффекта.
4. Мощность ультразвука и характер экстрагента могут влиять на протекание окислительных процессов в экстракте, причем такие явления характерны не только для слишком высоких мощностей, но и для низких.
5. Ультразвук может значительно повысить выход биологически активных соединений даже при водной экстракции свежего сырья. При этом во всех проанализированных источниках отмечено, что применяемые параметры ультразвуковой экстракции обеспечивают сохранность анализируемых биологически активных веществ, либо путем проведения детального ВЭЖХ-анализа, либо путем доказательства данного факта анализом суммы экстрагируемых соединений или антиоксидантной активности экстракта.
6. Отличительной особенностью ультразвуковой экстракции является возможность широкого выбора экстрагентов: как органических растворите-

лей (этанол, метанол, этилацетат, ацетон), так и воды, а также смесей различных экстрагентов.

7. Ультразвуковая экстракция применяется не только для интенсификации традиционных технологий получения настоек и экстрактов, но и в сочетании с такими эффективными и современными методами, как сверхкритическая флюидная и двухфазная экстракции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maroun R.G., Rajha H.N., Darra N.E., Kantar S.E., Chacar S., Debs E., Vorobiev E., Louka N. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. In: Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Amsterdam: Elsevier; 2018. P. 265–293.
2. Zoumpoulakis P., Sinanoglou V. J., Siapi E., Heropoulos G., Proestos C. Evaluating Modern Techniques for the Extraction and Characterisation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds Phenolics. *Antioxidants*. 2017;6(3):46. DOI: 10.3390/antiox6030046.
3. Dzah C. S., Duan Y., Zhang H., Wen C., Zhang J., Chen G., Ma H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*. 2020;35:100547. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100547.
4. Lavilla I., Bendicho C. Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In: Water Extraction of Bioactive Compounds. Amsterdam: Elsevier; 2017. P. 291–316. DOI: 10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5.
5. Madhu B., Srinivas M. S., Srinivas G., Jain S. K. Ultrasonic Technology and Its Applications in Quality Control, Processing and Preservation of Food: A Review. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 2019;32(5):1–11. DOI: 10.9734/CJAST/2019/46909.
6. Petkova N., Ivanov I., Vrancheva R., Denev P., Pavlov A. Ultrasound and Microwave-Assisted Extraction of Elecampane (*Inula helenium*) Roots. *Natural Product Communications*. 2017;12(2):1934578X1701200. DOI: 10.1177/1934578X1701200207.
7. Rodsamran P., Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*. 2019;28:66–73. DOI: 10.1016/j.fbio.2019.01.017.
8. Maran J. P., Manikandan S., Nivetha C. V., Dinesh R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(1):S1145–S1157. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.02.007.
9. Da Porto C., Porretto E., Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(4):1076–1080. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.12.002.
10. Van Man P., Vu T. A., Hai T. C. Effect of ultrasound on extraction of polyphenol from the old tea leaves. *Annals. Food Science and Technology*. 2017;18(1):44–50.
11. Yang X., Li Yu., Li S., Oladejo A.O., Ruan S., Wang Yu., Huang Sh., Ma H. Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;38:19–28. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.02.026.
12. Fernando C. D., Soysa P. Extraction Kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing. *Nutrition Journal*. 2015;14(1):74. DOI: 10.1186/s12937-015-0060-x.
13. Carciochi R. A., Manrique G. D., Dimitrov K. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(7):4396–4404. DOI: 10.1007/s13197-014-1514-4.
14. Altemimi A., Watson D. G., Choudhary R., Dasari M. R., Lightfoot D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0148758. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758.

15. Zou T.-B., Xia E.-Q., He T.-P., Huang M.-Y., Jia Q., Li H.-W. Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology. *Molecules*. 2014;19(2):1411–1421. DOI: 10.3390/molecules19021411.
16. Vankar P. S., Srivastava J. Ultrasound-Assisted Extraction in Different Solvents for Phytochemical Study of *Canna indica*. *International Journal of Food Engineering*. 2010;6(3). DOI: 10.2202/1556-3758.1599.
17. Dzah C. S. Influence of fruit maturity on antioxidant potential and chilling injury resistance of peach fruit (*Prunus persica*) during cold storage. *African J Food, Agric Nutr Dev*. 2014;14(7):9578–9591.
18. Zengin G., Cvetanović A., Gašić U., Stupar A., Bulut G., Şenkardeş I., Dogan A., Sinan K. I., Uysal S., Aumeeruddy-Elalfi Z., Aktumsek A., Mahomoodally M. F. Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. *Industrial Crops and Products*. 2020;146:112202. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.
19. Сульман М. Г., Анкудинова Т. В., Пирог Д. Н., Сульман Э. М., Семагина Н. В. Способ экстракции из твердого растительного сырья. Патент РФ на изобретение № 2104733. 06.11.1996. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2104733C1_19980220. Ссылка активна на 28.09.2021.
20. Зуев Н. М., Сизова Н. М., Спивак В. Л. Способ получения сухого водорастворимого экстракта из растительного сырья. Патент РФ на изобретение № 2005124561. 02.08.2005. Бюл. № 4. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2005124561A_20070210. Ссылка активна на 28.09.2021.
21. Литвинцев С. Г., Мартинсон Е. А., Злобин А. А. Способ выделения пектиновых веществ в нативном состоянии из плодовых оболочек шиповника. Патент РФ на изобретение № 2485804. 16.03.2010. Бюл. № 27. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2485804C2_20130627. Ссылка активна на 28.09.2021.
22. Живописцев В. С. Установка для экстракции биологического сырья сжиженными газами. Патент РФ на изобретение № 96121. 17.03.2010. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU96121U1_20100720. Ссылка активна на 28.09.2021.
23. Шубенкова Е. Г., Чжу О. П., Лобова Ю. Ю., Лутаева И. А. Исследование влияния условий экстракции на извлечение биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами. *Вестник Новосибирского государственного педагогического университета*. 2013;5(15):144–148.
24. Valeeva A. R., Makarova N. V., Valiulina D. F. Optimisation of conditions for extracting bioactive compounds exhibiting antioxidant properties from hawthorn fruit (*Crataegus*). *Proceedings of Universities Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):239–249. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-2-239-249.
25. Ставрианиди А. Н., Родин И. А., Браун А. В., Шпигун О. А. Быстрый способ ультразвуковой экстракции Гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня для ВЭЖХ-МС/МС анализа. *Аналитика и контроль*. 2013;17(4):459–464.
26. Макарова Н. В., Еремеева Н. Б. Сравнительное изучение влияния ультразвуковых воздействий на экстракцию антиоксидантных соединений ягод черники (*Vaccinium myrtillus* L.). *Химия растительного сырья*. 2020;1:167–177. DOI: 10.14258/jcprm.2020014425.
27. Макарова Н. В., Валиулина Д. Ф., Еремеева Н. Б. Сравнительные исследования методов извлечения биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами из косточек винограда (*Vitis vinifera* L.). *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020;10(1):140–148. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-1-140-148.
28. Еремеева Н. Б., Макарова Н. В. Влияние технологии экстракции на антиоксидантную активность экстрактов плодов черноплодной рябины. *Вестник МГТУ*. 2017;20(3):600–608. DOI: 10.21443/1560-9278-2017-20-3-600-608.
29. Апаева А. В., Ямансарова Э. Т., Куковинцев О. С., Зворыгина О. Б. Влияние ультразвукового облучения на извлечение флавоноидов из зеленой массы гречихи. *Вестник Башкирского университета*. 2016;21(1):69–72.
30. Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е. Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного с высоким содержанием биологически активных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):35–39. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-35-39.
31. Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., Лужанин В. Г., Шилов С. В., Новикова К. О. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):49–55. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-49-55.
32. Жиякова Е. Т., Цветкова З. Е., Писарев Д. И., Бойко Н. Н., Тимошенко Е. Ю. Интенсификация процесса производства густого экстракта плодов расторопши пятнистой с использованием ультразвуковой обработки сырья. *Фармация и фармакология*. 2018;6(5):475–487. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-5-475-487.
33. Рудометова Н. В., Ким И. С. Исследование экстракции капсаицина из плодов острого перца рода *Capsicum*. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2019;1:62–73.
34. Попова Н. В., Потороко И. Ю. Повышение эффективности экстракции биологически активных веществ из растительного сырья методом ультразвукового воздействия. *Вестника ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии»*. 2018;6(1):14–22. DOI: 10.14529/food180102.
35. Загорюлько Е. Ю., Теслев А. А., Ожигова М. Г. Разработка и оптимизация технологии ультразвукового экстрагирования ромашки аптечной цветков (*Chamomilla Recutita* flores). *Фармация и фармакология*. 2018;6(2):151–166. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-2-151-166.
36. Милевская В. В., Статкус М. А., Темердашев З. А., Киселева Н. В., Бутыльская Т. С., Шилько Е. А. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе. *Журнал аналитической химии*. 2016;71(7):768–774.
37. Подолина Е. А., Ханина М. А., Рудаков О. Б., Небольсин А. Е. Ультразвуковая экстракция и УФ-спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов и дубильных веществ в надземной части василька синего. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2018;2:28–35.
38. Tiwari B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;71:100–109. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.013.
39. Segovia F. J., Corral-Pérez J. J., Almajano M. P. Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*. 2016;85:213–220. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.03.005.
40. Sousa A. D., Maia A. I. V., Rodrigues T. H. S., Canuto K. M., Ribeiro P. R. V., de Cassia Alves Pereira R., Vieira R. F., de Brito E. S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. *Industrial Crops and Products*. 2016;79:91–103. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.10.045.
41. Rodrigues D., Freitas A. C., Sousa S., Amorim M., Vasconcelos M. W., da Costa J. P., Silva A. M. S., Rocha-Santos T. A. P., Duarte A. C., Gomes A. M. P. Chemical and structural characterization of *Pholiota nameko* extracts with biological properties. *Food Chemistry*. 2017;216:176–85. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.030.
42. Khemakhem I., Ahmad-Qasem M. H., Catalán E. B., Micol V., García-Pérez J. V., Ayadi M. A., Bouaziz M. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;34:466–473. DOI: 10.1016/j.ulsonch.2016.06.010.
43. Kazemi M., Karim R., Mirhosseini H., Hamid A. A., Tamnak S. Processing of Parboiled Wheat Noodles Fortified with Pulsed Ultrasound Pomegranate (*Punica granatum* L. var. Malas) Peel Extract. *Food and Bioprocess Technology*. 2017;10(2):379–393. DOI: 10.1007/s11947-016-1825-8.
44. Chan C.-H., See T.-Y., Yusoff R., Ngoh G.-C., Kow K.-W. Extraction of bioactives from *Orthosiphon stamineus* using microwave and ultrasound-assisted techniques: Process optimization and scale up. *Food Chemistry*. 2017;221:1382–1387. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.016.

45. Tomšik A., Pavlič B., Vradić J., Ramić M., Brindza J., Vidović S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016;29:502–511. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.11.005.
46. Al-Suod H., Ratiu I.-A., Krakowska-Sieprawska A., Lahuta L., Górecki R., Buszewski B. Supercritical fluid extraction in isolation of cyclitols and sugars from chamomile flowers. *Journal of Separation Science*. 2019;42(20):3243–3252. DOI: 10.1002/jssc.201900539.
47. Dzah C. S., Duan Yu., Zhang H., Wen C., Zhang J., Chen G., Ma H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*. 2020;35:100547. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100547.
48. Llorent-Martínez E. J., Zengin G., Sinan K. I., Polat R., Canlı D., Picot-Allain M. C. N., Mahomoodally M. F. Impact of different extraction solvents and techniques on the biological activities of *Cirsium yildizianum* (Asteraceae: Cynareae). *Industrial Crops and Products*. 2020;144:112033. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112033.
49. Zengin G., Cvetanović A., Gašić U., Stupar A., Bulut G., Şenkardes I., Dogan A., Sinan K. I., Uysal S., Aumeeruddy-Elalfi Z., Ak-tumsek A., Mahomoodally M. F. Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. *Industrial Crops and Products*. 2020;146:112202. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.
50. Zoumpoulakis P., Sinanoglou V. J., Siapi E., Heropoulos G., Proestos C. Evaluating Modern Techniques for the Extraction and Characterisation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds Phenolics. *Antioxidants*. 2017;6(3):46. DOI: 10.3390/antiox6030046.
51. Chen G., Fang C., Chen X., Wang Z., Liu M., Kan J. High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Mentha haplocalyx*: Structure, functional and biological activities. *Industrial Crops and Products*. 2019;130:273–284. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.086.
52. Seukep A. J., Zhang Y.-L., Xu Y.-B., Guo M.-Q. In Vitro Antibacterial and Antiproliferative Potential of *Echinops lanceolatus* Mattf. (Asteraceae) and Identification of Potential Bioactive Compounds. *Pharmaceuticals*. 2020;13(4):59. DOI: 10.3390/ph13040059.
53. Moczowska M., Karp S., Niu Y., Kurek M. A. Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed – A physicochemical approach. *Food Hydrocolloids*. 2019;90:105–112. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.12.018.
54. Rodsamran P., Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*. 2019;28:66–73. DOI: 10.1016/j.fbio.2019.01.017.
55. Santos K. A., Gonçalves J. E., Cardozo-Filho L., da Silva E. A. Pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction of α -bisabolol from candeia (*Eremanthus erythropappus*) wood. *Industrial Crops and Products*. 2019;130:428–435. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.01.013.
56. Sharayei P., Azarpazhooh E., Zomorodi S., Ramaswamy H. S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT*. 2019;101:342–350. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.031.
57. Sut S., Dall'Acqua S., Zengin G., Senkardes I., Bulut G., Cvetanović A., Stupar A., Mandić A., Picot-Allain C., Dogan A., Sinan K. I., Mahomoodally F. Influence of different extraction techniques on the chemical profile and biological properties of *Anthemis cotula* L.: Multifunctional aspects for potential pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;173:75–85. DOI: 10.1016/j.jpharm.2012.04.027.
58. St-Pierre F., Achim A., Stevanovic T. Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Industrial Crops and Products*. 2013;41:179–187. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.027.
59. Stroe, A.-C., Oancea S. Ultrasound-assisted and enzyme-assisted extraction of fructans and phenolics from parsnip (*Pastinaca sativa* L.). *Current Trends in Natural Sciences*. 2019;8(15):29–34.
60. Valachovic P., Pechova A., Mason T. J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2001;8(2):111–117. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00066-3.
61. Hromádková Z., Ebringerová A., Valachovič P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2002;9(1):37–44. DOI: 10.1016/S1350-4177(01)00093-1.
62. Zhang X., Ban Q., Wang X., Wang Z. Green and Efficient PEG-Based Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharides from Tree Peony Pods and the Evaluation of Their Antioxidant Activity In Vitro. *BioMed Research International*. 2018;2018:1–7. DOI: 10.1155/2018/2121385.
63. Bimkr M., Rahman R. A., Taip F. S., Adzahan N. M., Sarker Md. Z. I., Ganjloo A. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Crude Oil from Winter Melon (*Benincasa hispida*) Seed Using Response Surface Methodology and Evaluation of Its Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Fatty Acid Composition. *Molecules*. 2012;17(10):11748–11762. DOI: 10.3390/molecules171011748.
64. Cares M. G., Vargas Y., Gaete L., Sainz J., Alarcon J. Ultrasonically assisted Extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Physics Procedia*. 2010;3(1):169–178. DOI: 10.1016/j.phpro.2010.01.024.
65. Mansoori S., Bahmanyar H., Ozumchelouei E. J., Najafipour I. Investigation and optimisation of the extraction of carvone and limonene from the Iranian *Mentha spicata* through the ultrasound-assisted extraction method. *Indian Chemical Engineer*. 2020;1–10. DOI: 10.1080/00194506.2020.1831407.
66. Думитраш П. Г., Болога М. К., Шемякова Т. Д. Ультразвуковая экстракция биологически активных соединений из семян томатов. *Электронная обработка материалов*. 2016;52(3):47–52.

REFERENCES

1. Maroun R. G., Rajha H. N., Darra N. E., Kantar S. E., Chacar S., Debs E., Vorobiev E., Louka N. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. In: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Amsterdam: Elsevier; 2018. P. 265–293.
2. Zoumpoulakis P., Sinanoglou V. J., Siapi E., Heropoulos G., Proestos C. Evaluating Modern Techniques for the Extraction and Characterisation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds Phenolics. *Antioxidants*. 2017;6(3):46. DOI: 10.3390/antiox6030046.
3. Dzah C. S., Duan Y., Zhang H., Wen C., Zhang J., Chen G., Ma H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*. 2020;35:100547. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100547.
4. Lavilla I., Bendicho C. Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In: *Water Extraction of Bioactive Compounds*. Amsterdam: Elsevier; 2017. P. 291–316. DOI: 10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5.
5. Madhu B., Srinivas M. S., Srinivas G., Jain S. K. Ultrasonic Technology and Its Applications in Quality Control, Processing and Preservation of Food: A Review. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 2019;32(5):1–11. DOI: 10.9734/CJAST/2019/46909.
6. Petkova N., Ivanov I., Vrancheva R., Denev P., Pavlov A. Ultrasound and Microwave-Assisted Extraction of Elecampane (*Inula helenium*) Roots. *Natural Product Communications*. 2017;12(2):1934578X1701200. DOI: 10.1177/1934578X1701200207.
7. Rodsamran P., Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*. 2019;28:66–73. DOI: 10.1016/j.fbio.2019.01.017.
8. Maran J. P., Manikandan S., Nivetha C. V., Dinesh R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response

- surface design. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(1):S1145–S1157. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.02.007.
9. Da Porto C., Porretto E., Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(4):1076–1080. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.12.002.
10. Van Man P., Vu T. A., Hai T. C. Effect of ultrasound on extraction of polyphenol from the old tea leaves. *Annals. Food Science and Technology*. 2017;18(1):44–50.
11. Yang X., Li Yu., Li S., Oladejo A.O., Ruan S., Wang Yu., Huang Sh., Ma H. Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;38:19–28. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.02.026.
12. Fernando C. D., Soysa P. Extraction Kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing. *Nutrition Journal*. 2015;14(1):74. DOI: 10.1186/s12937-015-0060-x.
13. Carciochi R. A., Manrique G. D., Dimitrov K. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(7):4396–4404. DOI: 10.1007/s13197-014-1514-4.
14. Altemimi A., Watson D. G., Choudhary R., Dasari M. R., Lightfoot D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0148758. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758.
15. Zou T.-B., Xia E.-Q., He T.-P., Huang M.-Y., Jia Q., Li H.-W. Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology. *Molecules*. 2014;19(2):1411–1421. DOI: 10.3390/molecules19021411.
16. Vankar P. S., Srivastava J. Ultrasound-Assisted Extraction in Different Solvents for Phytochemical Study of *Canna indica*. *International Journal of Food Engineering*. 2010;6(3). DOI: 10.2202/1556-3758.1599.
17. Dzhah C. S. Influence of fruit maturity on antioxidant potential and chilling injury resistance of peach fruit (*Prunus persica*) during cold storage. *African J Food, Agric Nutr Dev*. 2014;14(7):9578–9591.
18. Zengin G., Cvetanović A., Gašić U., Stupar A., Bulut G., Šenkardes I., Dogan A., Sinan K. I., Uysal S., Aumeeruddy-Elalfi Z., Aktumsek A., Mahomoodally M. F. Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. *Industrial Crops and Products*. 2020;146:112202. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.
19. Sul'man M. G., Ankudinova T. V., Pirog D. N., Sul'man Eh. M., Semagina N. V. *Sposob ekstraksii iz tverdogo rastitel'nogo syr'ya* [Method of extraction from solid vegetable raw material]. Patent RUS № 2104733. 06.11.1996. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2104733C1_19980220. Accessed: 28.09.2021. (In Russ.)
20. Zuev N. M., Sizova N. M., Spivak V. L. *Sposob polucheniya sukhogo vodorastvorimogo ekstrakta iz rastitel'nogo syr'ya* [Method of producing dry water-soluble extract from vegetable raw materials]. Patent RUS № 2005124561. Byul. № 4. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2005124561A_20070210. Accessed: 28.09.2021. (In Russ.)
21. Litvinets S. G., Martinson E. A., Zlobin A. A. *Sposob vydeleniya pektinovykh veshchestv v nativnom sostoyanii iz plodovykh obolochek shipovnika* [Method for extraction of pectin substances in native state from rosehip fruit shells]. Patent RUS № 2485804. 16.03.2010. Byul. № 27. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2485804C2_20130627. Accessed: 28.09.2021. (In Russ.)
22. Zhivopishev V. S. *Ustanovka dlya ekstraksii biologicheskogo syr'ya szhizhennymi gazami* [Unit for extraction of biological raw materials with liquefied gases]. Patent RUS № 96121. 17.03.2010. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU96121U1_20100720. Accessed: 28.09.2021. (In Russ.)
23. Shubenkova E. G., Chzhu O. P., Lobova Ju. Y., Lutaeva I. A. Study the influence of extraction conditions on elicitation of biologically active substances with antioxidant properties. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta = Novosibirsk state pedagogical university*. 2013;5(15):144–148. (In Russ.)
24. Valeeva A. R., Makarova N. V., Valiulina D. F. Optimisation of conditions for extracting bioactive compounds exhibiting antioxidant properties from hawthorn fruit (*Crataegus*). *Proceedings of Universities Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):239–249. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-2-239-249.
25. Stavrianidi A. N., Rodin I. A., Braun A. V., Shpigun O. A. Rapid method of ultrasound-assisted extraction of Ginsenosides from plant materials and ginseng products applicable for HPLC-MS/MS analysis. *Analitika i kontrol = Analytics and Control*. 2013;17(4):459–464. (In Russ.)
26. Makarova N. V., Yeremeyeva N. B. Comparative study of the influence of ultrasonic influences on the extraction of anti-oxidant compounds of blackberry berries (*Vaccinium myrtillus* L.). *Khimija rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2020;1:167–177. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2020014425.
27. Makarova N.V., Valiulina D.F., Ereemeeva N.B. Comparative studies of extraction methods of biologically-active substances with antioxidant properties from grape seed (*Vitis vinifera* L.). *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(1):140–148. (In Russ.) DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-1-140-148.
28. Ereemeeva N. B., Makarova N. V. The effect of extraction technology on antioxidant activity of black chokeberry. *Vestnik MGTU*. 2017;20(3):600–608. (In Russ.) DOI: 10.21443/1560-9278-2017-20-3-600-608.
29. Apaeva A. V., Yamansarova E. T., Kukovinets O. S., Zvorogina O. B. The effect of ultrasonic irradiation on extraction of flavonoids from green mass of buckwheat. *Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of Bashkir University*. 2016;21(1):69–72. (In Russ.)
30. Belokurov S. S., Flysyuk E. V., Smekhova I. E. Choice of Extraction Method for Receiving Extraction from Seeds of Payne Hay with the High Content of Biologically Active Substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):35–39. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-35-39.
31. Belokurov S. S., Flysyuk E. V., Narkevich I. A., Luzhanin V. G., Shilov S. V., Novikova K. O. Comparative Analysis of Perspective Extragation Methods for Receiving Extractions from Fenugreek Seeds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):49–55. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-49-55.
32. Zhilyakova E. T., Tsvetkova Z. E., Pisarev D. I., Boyko N. N., Tymoshenko E. Yu. Intensification of production process of thick extract of milk thistle fruits by ultrasonic processing of raw materials. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology*. 2018;6(5):475–487. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-5-475-487.
33. Rudometova N. V., Kim I. S. Capsaicin extraction from hot pepper of *Capsicum* genus. Scientific Journal NRU ITMO. *Nauchnyy zhurnal NIU ITMO. Seriya "Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv" = Processes and Food Production Equipment*. 2019;1:62–73. (In Russ.)
34. Popova N. V., Potoroko I. Yu. Increase of efficiency of biologically active substance extraction from vegetable raw material by ultrasonic treatment. *Vestnika YuUrGU. Seriya «Pishchevye i biotekhnologii» = Bulletin of the South Ural State University Series Food and Biotechnology*. 2018;6(1):14–22. (In Russ.) DOI: 10.14529/food180102.
35. Zagorulko E. Y., Teslev A. A., Ozhigova M. G. Development and optimization of ultrasound extraction of chamomile flowers (*Chamomillae Recutita flores*). 2018;6(2):151–166. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-2-151-166.
36. Milevskaya V. V., Temerdashev Z. A., Kiseleva N. V., Butyl'skaya T. S., Shil'ko E. A. *Ekstraktsiya i opredelenie biologicheskikh aktivnykh komponentov zveroboya i preparatov na ego osnove* [Extraction and determination of biologically active components of St. John's wort and its pharmaceutical preparations]. *Zhurnal analiticheskoy khimii = Journal of Analytical Chemistry*. 2016;71(7):768–774. (In Russ.)

37. Podolina E. A., Khanina M. A., Rudakov O. B., Nebolsin A. E. Ultrasonic extraction and UV spectrophotometric determination of the amount of flavonoids and tanning agents in the above-ground part of a bluebottle. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2018;2:28–35. (In Russ.)
38. Tiwari B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;71:100–109. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.013.
39. Segovia F. J., Corral-Pérez J. J., Almajano M. P. Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*. 2016;85:213–220. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.03.005.
40. Sousa A. D., Maia A. I. V., Rodrigues T. H. S., Canuto K. M., Ribeiro P. R. V., de Cassia Alves Pereira R., Vieira R. F., de Brito E. S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. *Industrial Crops and Products*. 2016;79:91–103. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.10.045.
41. Rodrigues D., Freitas A. C., Sousa S., Amorim M., Vasconcelos M. W., da Costa J. P., Silva A. M. S., Rocha-Santos T. A. P., Duarte A. C., Gomes A. M. P. Chemical and structural characterization of Pholiota nameko extracts with biological properties. *Food Chemistry*. 2017;216:176–85. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.030.
42. Khemakhem I., Ahmad-Qasem M. H., Catalán E. B., Micol V., García-Pérez J. V., Ayadi M. A., Bouaziz M. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;34:466–473. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.010.
43. Kazemi M., Karim R., Mirhosseini H., Hamid A. A., Tamnak S. Processing of Parboiled Wheat Noodles Fortified with Pulsed Ultrasound Pomegranate (*Punica granatum* L. var. Malas) Peel Extract. *Food and Bioprocess Technology*. 2017;10(2):379–393. DOI: 10.1007/s11947-016-1825-8.
44. Chan C.-H., See T.-Y., Yusoff R., Ngho G.-C., Kow K.-W. Extraction of bioactives from Orthosiphon stamineus using microwave and ultrasound-assisted techniques: Process optimization and scale up. *Food Chemistry*. 2017;221:1382–1387. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.016.
45. Tomšik A., Pavlič B., Vladoč J., Ramič M., Brindza J., Vidović S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016;29:502–511. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.11.005.
46. Al-Suod H., Ratiu I.-A., Krakowska-Sieprawska A., Lahuta L., Górecki R., Buszewski B. Supercritical fluid extraction in isolation of cyclitols and sugars from chamomile flowers. *Journal of Separation Science*. 2019;42(20):3243–3252. DOI: 10.1002/jssc.201900539.
47. Dzah C. S., Duan Yu., Zhang H., Wen C., Zhang J., Chen G., Ma H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*. 2020;35:100547. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100547.
48. Llorent-Martínez E. J., Zengin G., Sinan K. I., Polat R., Canlı D., Picot-Allain M. C. N., Mahomoodally M. F. Impact of different extraction solvents and techniques on the biological activities of *Cirsium yildizianum* (Asteraceae: Cynareae). *Industrial Crops and Products*. 2020;144:112033. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112033.
49. Zengin G., Cvetanović A., Gašić U., Stupar A., Bulut G., Şenkardeş I., Dogan A., Sinan K. I., Uysal S., Aumeeruddy-Elalfi Z., Akumsek A., Mahomoodally M. F. Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. *Industrial Crops and Products*. 2020;146:112202. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.
50. Zoumpoulakis P., Sinanoglou V. J., Siapi E., Heropoulos G., Proestos C. Evaluating Modern Techniques for the Extraction and Characterisation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds Phenolics. *Antioxidants*. 2017;6(3):46. DOI: 10.3390/antiox6030046.
51. Chen G., Fang C., Chen X., Wang Z., Liu M., Kan J. High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Mentha haplocalyx*: Structure, functional and biological activities. *Industrial Crops and Products*. 2019;130:273–284. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.086.
52. Seukep A. J., Zhang Y.-L., Xu Y.-B., Guo M.-Q. In Vitro Antibacterial and Antiproliferative Potential of *Echinops lanceolatus* Mattf. (Asteraceae) and Identification of Potential Bioactive Compounds. *Pharmaceuticals*. 2020;13(4):59. DOI: 10.3390/ph13040059.
53. Moczowska M., Karp S., Niu Y., Kurek M. A. Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed – A physicochemical approach. *Food Hydrocolloids*. 2019;90:105–112. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.12.018.
54. Rodsamran P., Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*. 2019;28:66–73. DOI: 10.1016/j.fbio.2019.01.017.
55. Santos K. A., Gonçalves J. E., Cardozo-Filho L., da Silva E. A. Pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction of α-bisabolol from candeia (*Eremanthus erythropappus*) wood. *Industrial Crops and Products*. 2019;130:428–435. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.01.013.
56. Sharayei P., Azarpazhooh E., Zomorodi S., Ramaswamy H. S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT*. 2019;101:342–350. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.031.
57. Sut S., Dall'Acqua S., Zengin G., Senkardes I., Bulut G., Cvetanović A., Stupar A., Mandić A., Picot-Allain C., Dogan A., Sinan K. I., Mahomoodally F. Influence of different extraction techniques on the chemical profile and biological properties of *Anthemis cotula* L.: Multifunctional aspects for potential pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;173:75–85. DOI: 10.1016/j.jpharm.2019.04.027.
58. St-Pierre F., Achim A., Stevanovic T. Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Industrial Crops and Products*. 2013;41:179–187. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.027.
59. Stroe, A.-C., Oancea S. Ultrasound-assisted and enzyme-assisted extraction of fructans and phenolics from parsnip (*Pastinaca sativa* L.). *Current Trends in Natural Sciences*. 2019;8(15):29–34.
60. Valachovic P., Pechova A., Mason T. J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2001;8(2):111–117. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00066-3.
61. Hromádková Z., Ebringerová A., Valachovič P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2002;9(1):37–44. DOI: 10.1016/S1350-4177(01)00093-1.
62. Zhang X., Ban Q., Wang X., Wang Z. Green and Efficient PEG-Based Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharides from Tree Peony Pods and the Evaluation of Their Antioxidant Activity In Vitro. *BioMed Research International*. 2018;2018:1–7. DOI: 10.1155/2018/2121385.
63. Bimakr M., Rahman R. A., Taip F. S., Adzahan N. M., Sarker Md. Z. I., Ganjloo A. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Crude Oil from Winter Melon (*Benincasa hispida*) Seed Using Response Surface Methodology and Evaluation of Its Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Fatty Acid Composition. *Molecules*. 2012;17(10):11748–11762. DOI: 10.3390/molecules171011748.
64. Cares M. G., Vargas Y., Gaete L., Sainz J., Alarcon J. Ultrasonically assisted Extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Physics Procedia*. 2010;3(1):169–178. DOI: 10.1016/j.phpro.2010.01.024.
65. Mansoori S., Bahmanyar H., Ozumchelouei E. J., Najafipour I. Investigation and optimisation of the extraction of carvone and limonene from the Iranian *Mentha spicata* through the ultrasound-assisted extraction method. *Indian Chemical Engineer*. 2020;1–10. DOI: 10.1080/00194506.2020.1831407.
66. Dumitrash P. G., Bologa M. K., Shemyakova T. D. Ul'trazvukovaya ekstraktsiya biologicheskii aktivnykh soedineniy iz semyan tomatov [Ultrasonic extraction of biologically active compounds from tomato seeds]. *Elektronnaya Obrabotka Materialov = Electronic Processing of Materials*. 2016;52(3):47–52. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127>
УДК 615.3



Обзорная статья / Review article

Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор)

Н. Н. Порфирьева¹, И. И. Семина², Р. И. Мустафин^{1,2*}, В. В. Хуторянский^{1,3**}

¹ Институт фармации, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

² Центральная научно-исследовательская лаборатория, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Толстого, д. 6

³ Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

*Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

**Контактное лицо: Хуторянский Виталий Викторович. E-mail: v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

ORCID: Н. Н. Порфирьева – <https://orcid.org/0000-0002-7110-2093>; И. И. Семина – <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>; Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>;
В. В. Хуторянский – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>.

Статья поступила: 01.10.2021

Статья принята в печать: 12.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Интраназальная доставка лекарственных средств напрямую из носа в мозг является одним из многообещающих направлений для лечения заболеваний головного мозга, включающих нейродегенеративные расстройства, инсульт, опухоли головного мозга и т. д.

Текст. Доставка лекарства через нос имеет ряд преимуществ, среди которых быстрое наступление фармакологического эффекта, возможность обхода гематоэнцефалического барьера, снижение вероятности возникновения побочных эффектов, а также быстрый и неинвазивный способ введения. Однако существенными недостатками данного пути является сравнительно быстрое вымывание с поверхности слизистой оболочки, плохое проникновение лекарства через слизистую носа, мукоцилиарный клиренс и действие протеолитических ферментов. В настоящее время для преодоления вышеуказанных ограничений используются различные направления, среди которых следует отметить разработку систем доставки из носа в мозг, представляющих собой мукоадгезивные, мукус-проникающие и гелеобразующие системы, способствующие удерживанию или проникновению лекарств через слизистую оболочку. При этом значительную роль при конструировании такого рода систем занимают высокомолекулярные соединения. В частности, мукоадгезивные системы могут быть получены из катионных и анионных полимеров. Недавние исследования также показали проявление мукоадгезивных свойств у интерполиэлектролитных комплексов. Увеличение мукоадгезивных свойств полимеров при конструировании систем доставки лекарств может быть также достигнуто путем присоединения к ним различных функциональных групп, таких как тиолы, малеимиды, акрилаты, метакрилаты, катехолы и т. д. Мукус-проникающие системы могут быть получены путем ПЭГилирования наночастиц, а также функционализации с помощью некоторых поли-(2-оксазолинов), поливинилового спирта и др., что было показано на других слизистых оболочках организма. Наконец, увеличение проникновения возможно достичь путем использования муколитических средств в комбинации с неионогенными поверхностно-активными веществами. Другим подходом для увеличения эффективности доставки лекарств из носа в мозг является использование гелеобразующих систем. В частности, актуальным является гелеобразование *in situ*. Данный вид гелей на первом этапе представляет собой раствор, в дальнейшем в ответ на химическое и физическое воздействие происходит фазовый переход, сопровождающийся образованием геля. В зависимости от внешней стимуляции фазового перехода различают термо-, pH-, ионообратимые и другие системы, показавшие свою эффективность для доставки в мозг путем интраназального введения.

Заключение. Эффективная интраназальная доставка лекарственных средств и терапевтических агентов в мозг может быть достигнута путем использования мукоадгезивных, мукус-проникающих и гелеобразующих систем и/или их комбинаций.

Ключевые слова: системы доставки лекарств, интраназальное введение, доставка из носа в мозг

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

Вклад авторов. Н. Н. Порфирьева собрала и обработала материалы, написала черновик статьи. И. И. Семина, Р. И. Мустафин и В. В. Хуторянский участвовали в редактировании и анализе материалов, рецензировании и корректировке черновика рукописи. Рукопись была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию рукописи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 20-65-46007).

Для цитирования: Порфирьева Н. Н., Семина И. И., Мустафин Р. И. Хуторянский В. В. Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):117–127. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127>

Intranasal Administration as a Route to Deliver Drugs to the Brain (Review)

Natalia N. Porfiryeva¹, Irina I. Semina², Rouslan I. Moustafine^{1,2*}, Vitaliy V. Khutoryanskiy^{1,3**}

¹ Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

² Central Research Laboratory, Kazan State Medical University, 6, Tolstoy str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420012, Russia

³ Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

*Corresponding author: Rouslan I. Moustafine. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

**Corresponding author: Vitaliy V. Khutoryanskiy. E-mail: v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

ORCID: Natalia N. Porfiryeva – <https://orcid.org/0000-0002-7110-2093>; Irina I. Semina – <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>; Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>;
Vitaliy V. Khutoryanskiy – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>.

Received: 01.10.2021

Revised: 12.11.2021

Published: 25.11.2021

© Порфирьева Н. Н., Семина И. И., Мустафин Р. И. Хуторянский В. В., 2021

© Porfiryeva N. N., Semina I. I., Moustafine R. I. Khutoryanskiy V. V., 2021

Abstract

Introduction. Intranasal drug delivery from nose-to-brain is one of the promising approaches for the treatment of brain diseases including neurodegenerative diseases, stroke, brain tumors, etc.

Text. Delivery of drugs through the nose has a number of advantages, including the rapid onset of a pharmacological effect, the ability to bypass the blood-brain barrier, avoidance of some side effects and fast and non-invasive route of administration. However, the significant disadvantages of this route are rapid elimination of the drug from the surface of the mucosal membrane, poor penetration of the drug through the nasal mucosa, mucociliary clearance and effects of proteolytic enzymes. Currently, to overcome the above limitations, various approaches are used, including the development of delivery systems from nose-to-brain, which are mucoadhesive, mucus-penetrating and gel-forming systems that facilitate the retention or penetration of drugs through the mucosal membranes. At the same time, high-molecular weight compounds play a significant role in the design of these systems. In particular, mucoadhesive systems can be prepared from cationic and anionic polymers. Recent studies have also shown that interpolyelectrolyte complexes also exhibit mucoadhesive properties. An improvement in mucoadhesive properties of polymers can also be achieved by conjugating various functional groups such as thiols, maleimides, acrylates, methacrylates, catechols, etc. Mucus-penetrating systems can be prepared by PEGylation of nanoparticles, as well as functionalization with some poly(2-oxazolines), polyvinyl alcohol, etc. The mucus-penetrating ability of these polymers has been shown in other mucosal membranes in the body. Finally, increased penetration can be achieved by using mucolytic agents in combination with non-ionic surfactants. Another approach to increase the efficiency of drug delivery from nose-to-brain is the use of *in situ* gelling systems. Initially, this type of formulation exists as a solution; then a phase transition to gel is observed in response to chemical and physical effects. Depending on the external stimulation of the phase transition, thermo-, pH-, ion-reversible and other systems are known. These systems have shown effectiveness for delivery to the brain by intranasal administration.

Conclusion. Effective intranasal delivery of drugs and therapeutic agents to the brain can be achieved by using mucoadhesive, mucus-penetrating, gelling systems and/or their combinations.

Keywords: drug delivery systems, intranasal administration, nose-to-brain delivery

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

Contribution of the authors. Natalia N. Porfiryeva analysed literature and prepared manuscript draft. Irina I. Semina, Rouslan I. Moustafine and Vitaliy V. Khutoryanskiy edited and reviewed the manuscript draft. The manuscript was written with participation of all co-authors. All of the authors agreed on the final version of the manuscript.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project № 20-65-46007 (to N.N.P., I.I.S., V.V.K. and R.I.M.).

For citation: Porfiryeva N.N., Semina I.I., Moustafine R.I. Khutoryanskiy V.V. Intranasal administration as a route to deliver drugs to the brain. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):117–127. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным направлением в медицине и фармации является интраназальная доставка лекарственных средств напрямую из носа в мозг. Обширный интерес к данному пути введения связан с его преимуществами, среди которых высокий уровень всасывания в системный кровоток, быстрое наступление фармакологического эффекта, высокая биодоступность, отсутствие «эффекта первого прохождения» через печеночный барьер; и большая распространенность заболеваний мозга, регистрируемых у населения. В частности, по данным Национального института неврологических расстройств и инсульта только в ряду нейродегенеративных заболеваний отмечается около 600 типов неврологических расстройств [1, 2], большинство из которых не поддаются полному излечению [3]. Основной причиной развития данного рода патологий является постепенная и необратимая гибель нервных клеток в центральной нервной системе (ЦНС), что ведет к когнитивным и двигательным нарушениям. Наиболее известными и распространенными заболеваниями из данной группы являются болезни Альцгеймера [4], Паркинсона [5],

Гентингтона [6] и Ниманна – Пика [7]. Фармакотерапия при этом направлена на симптоматическое лечение и ключевое значение имеет их ранняя диагностика.

Помимо нейродегенеративных расстройств, когнитивные нарушения могут быть обусловлены патологическими процессами, связанными с заболеваниями сосудов головного мозга [8, 9], и данный вид патологий играет ключевую роль при развитии инсульта [10]. Патогенез заболеваний сосудов головного мозга до конца не изучен [11, 12], что объясняется ограниченной возможности визуализации происходящих процессов.

Злокачественные опухоли мозга также относятся к распространенным заболеваниям ЦНС и занимают второе место по смертности от онкологии у детей [13]. Несмотря на значительные успехи терапии этих заболеваний, включающей в себя прием лекарственных средств, лучевую терапию, стереотаксическую радиохирургию и хирургическое лечение, прогноз остается, к сожалению, неутешительным.

Лекарственная терапия во многом ограничена ввиду наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), представляющего собой высокоорганизованную ге-

терогенную систему, которая контролирует перенос различных веществ из крови в мозг [14, 15]. ГЭБ состоит из плотно закрытых цереброваскулярных эндотелиальных клеток, перицитов и отростков астроцитов [16], каждый из которых, выполняя свои функции, формирует надежный барьер от проникновения различных ксенобиотиков. В поддержании гомеостаза мозга также участвует и гемато-ликворный барьер, ограничивающий ЦНС от кровеносного русла. Таким образом, благодаря работе гематоэнцефалического и гемато-ликворного барьеров обеспечивается защита ЦНС не только от проникновения патогенов, но и лекарственных средств [17].

Однако в последнее десятилетие внимание ученых все больше привлекает возможность обойти ГЭБ с помощью простого и неинвазивного способа – использования интраназального пути введения лекарственных средств.

Строение и физиологические особенности носовой полости

Наличие уникальных преимуществ интраназального пути введения для доставки лекарственных средств связано с анатомическим строением носовой полости. Полость носа разделена на две половины с помощью перегородки, которые образуют преддверие, дыхательную и обонятельную части [18], при этом общая площадь носовой полости составляет около 160 см² [19]. Спереди носовая полость представлена ноздрями, а сзади с помощью хоан (внутренние носовые отверстия) связывается с носовой частью глотки. Преддверие носа расположено под хрящевой частью носа и имеет небольшую площадь поверхности, покрытую плоским эпителием, который является про-

должением эпителиального покрова кожи (рисунок 1). В данной части также имеются потовые железы и реснички, которые фильтруют и очищают вдыхаемый воздух. Небольшая площадь поверхности в совокупности с низкой проницаемостью делает эту область менее привлекательной для доставки лекарственных средств [20, 21].

Дыхательная часть носовой полости покрыта слизистой оболочкой, состоящей из реснитчатого эпителия и соединительной ткани. В данной области имеются базальные, бокаловидные, нереснитчатые и мерцательные столбчатые клетки; последние два типа клеток имеют микроворсинки, а бокаловидные клетки продуцируют муцин, умеренно увлажняющий эпителий [20, 22] (рисунок 2).

Боковая стенка носовой полости имеет носовые раковины: нижнюю, среднюю и верхнюю, которые ограничивают соответствующие носовые ходы [23]. Эта часть имеет наибольшую площадь поверхности, обогащенную кровеносными сосудами, что делает ее наиболее благоприятным местом для абсорбции и системного действия лекарственных средств [24, 25]. Более того, данная область иннервируется первой (глазной) и второй (верхнечелюстной) ветвью тройничного нерва, начинающейся от моста ствола головного мозга. Она и может быть использована для доставки лекарственных средств в ЦНС [1, 26]. Обонятельная часть носовой полости находится выше средней носовой раковины и содержит обонятельные, поддерживающие и базальные клетки. Последний тип клеток выполняет функцию поддержания и восстановления слизистой оболочки в данной области. Поддерживающие клетки содержат микроворсинки, обеспечивающие сенсорную стимуляцию слизистой оболочки, и выполняют функцию механической

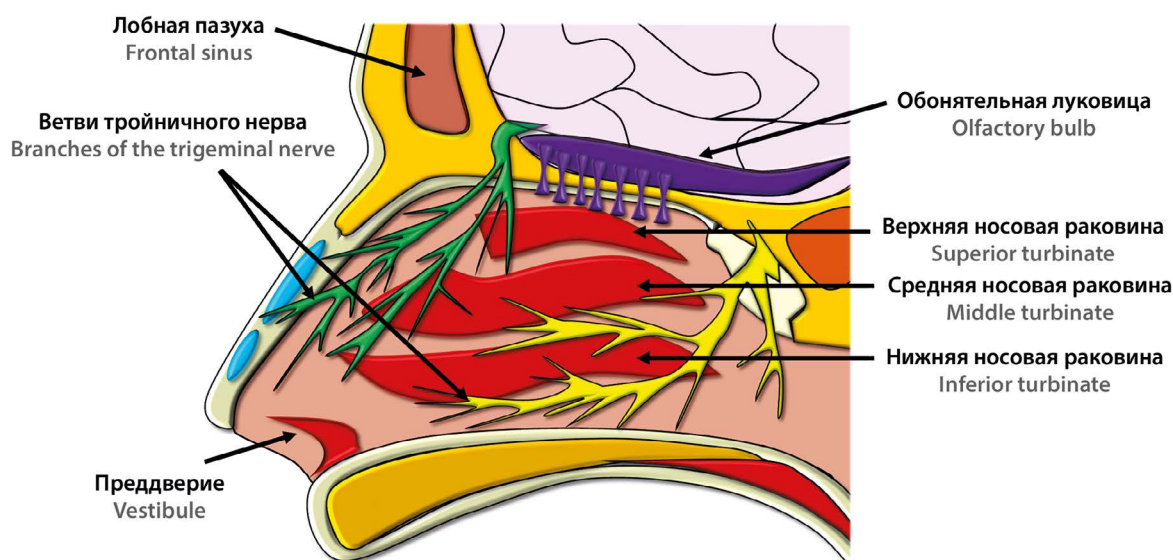


Рисунок 1. Схема сагиттального разреза полости носа

Figure 1. Schematic section of the nasal cavity

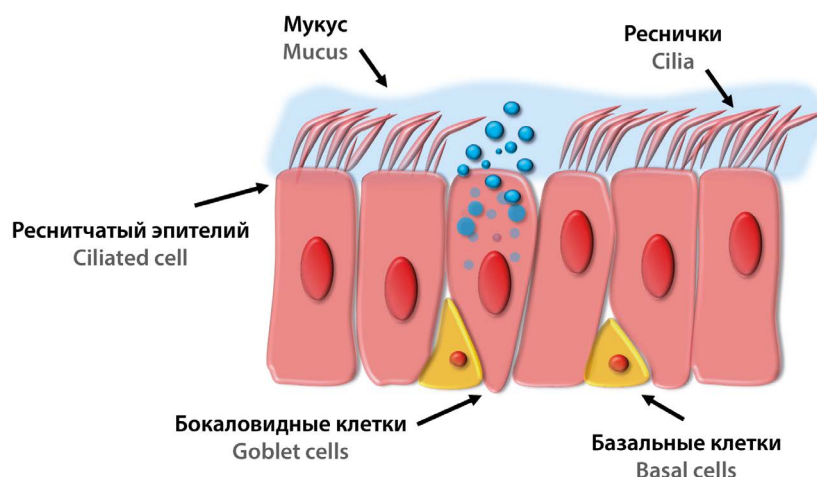


Рисунок 2. Схема реснитчатого эпителия полости носа

Figure 2. Schematic of the ciliary epithelium of the nasal cavity

поддержки эпителиальных клеток путем окружения нейронов обонятельных рецепторов [18, 27–29]. Обонятельные нервные пути являются основным центром доставки лекарственных средств в ЦНС, при этом наибольшая концентрация вводимых интраназально лекарственных средств наблюдается непосредственно в обонятельных луковицах [30]. Несомненно, важнейшей составляющей носовой полости, обеспечивающей местную защиту слизистой оболочки органов дыхания от различных внешних воздействий и попадания экзогенных веществ, включая лекарственные средства, является наличие мукоцилиарной системы или мукоцилиарного клиренса [31]. Мукоцилиарная система состоит из реснитчатого эпителия, перилициарного слоя секрета, увлажняющего поверхность и облегчающего колебательные движения (биение) ресничек, и непосредственно слизи (мукуса) [32]. Биение ресничек происходит в перилициарном слое и состоит из трех фаз: эффективный удар, при котором реснички выпрямляются и погружаются в слизь; далее следует продвижение слизи вперед, проталкивая при этом и экзогенные вещества и, в конечном итоге, – возвращение в фазу покоя, при котором ресничка лежит параллельно поверхности в направлении потока слизи [33]. Особую роль в функционировании мукоцилиарной системы играет как частота биения ресничек, так и их координированная работа [34]. Любая дисфункция в работе мукоцилиарного клиренса может привести к хроническим респираторным заболеваниям [32]. Ввиду наличия мукоцилиарного клиренса сокращается время нахождения лекарственных средств в носовой полости; в этой связи многообещающим направлением при конструировании систем доставки лекарств из носа в мозг становится использование вспомогательных веществ, обладающих вязкостью, усиливающих проницаемость слизистой оболочки или повышающих мукоадгезию [35].

Использование носовой полости для введения лекарственных средств

Интраназальный путь введения традиционно используется для местного лечения симптомов ринита. С этой целью широко применяются препараты различных фармакологических групп, включающих деконгестанты (сосудосуживающие), антигистаминные, противовирусные, антибактериальные и другие лекарственные средства.

При этом в истории медицины имеется достаточно примеров практического применения интраназального введения с целью проявления системного действия, в частности использование нюхательного табака, различных ароматических агентов, лечебных паровых ванн, газов и запрещенных наркотиков, таких как кокаин [29, 36].

В последнее же десятилетие интраназальный путь все чаще рассматривается как альтернативный способ введения лекарственных средств и терапевтических агентов в ЦНС [37] благодаря возможности обхода ГЭБ, обилию кровеносных сосудов, значительной области абсорбции лекарственных средств, уменьшению системных побочных эффектов, отсутствию эффекта первого прохождения через печень и наличию обонятельных нейронов. Более того, к настоящему времени накоплен значительный опыт использования различных лекарственных средств для целенаправленного воздействия на ЦНС [38]. Например, результаты, полученные при интраназальном введении крысам противопаркинсонического средства леводопы, продемонстрировали его быстрое и полное всасывание в системный кровоток, что открывает широкие возможности для лечения болезни Паркинсона [39]. Результаты исследований при внутривенном и интраназальном введении противозэпи-

лептического препарата – «Карбамазепин» – показали относительно схожие фармакокинетические профили, что подтверждает их быстрое достижение системного кровотока [40]. Имеются публикации об интраназальном введении анальгезирующих препаратов, в которых указывается перспективность использования данного пути в качестве альтернативного способа при невозможности проведения внутривенного введения [41].

Накоплен опыт интраназального введения различных белков, пептидов, гормонов и вакцин [42–44]. В частности, были проведены клинические испытания интраназального введения окситоцина для улучшения социального поведения у пациентов с нервными расстройствами [44, 45]. На фармацевтическом рынке имеется интраназальный спрей Syntocinon® (Novartis), представляющий собой раствор с содержанием окситоцина [46]. Показана перспективность интраназального введения инсулина для доставки в мозг при неврологических заболеваниях, ввиду положительного влияния на энергетический гомеостаз, способности к нейропротекции и возможности избежать периферических метаболических эффектов [47–50]. Результаты интраназального введения кроликам нейропептида гексарелина, стимулирующего выработку эндогенного соматотропина, продемонстрировали его прямой перенос из носа в мозг [51]. В виде назального спрея, под торговым наименованием Minirin® (SanofiAventis), производится раствор с содержанием десмопрессина (средства для лечения несахарного диабета), который показал наибольшую скорость абсорбции (около 3–5 %) по сравнению с сублингвальным и пероральным путями его введения [46]. Мощные гуморальные и клеточные иммунные ответы наблюдались как при внутримышечном, так и при интраназальном введении мышам вакцины против гриппа H7N9 [52].

Таким образом, интраназальное введение показало свою эффективность в качестве быстрого и неинвазивного способа и в настоящее время активно исследуется для доставки различных лекарственных средств и терапевтических агентов не только в качестве местной терапии, но и для целенаправленного воздействия на ЦНС.

Системы доставки из носа в мозг

Доставка лекарственных средств через нос, несомненно, является одним из многообещающих подходов для улучшения фармакотерапии заболеваний мозга [53]. Однако, несмотря на ряд преимуществ, интраназальный путь введения имеет свои недостатки для доставки лекарств и терапевтических агентов, среди которых быстрое их вымывание с поверхности слизистой оболочки, постоянная продукция секретов, действие протеолитических ферментов, наличие мукоцилиарного клиренса, относительно небольшой

объем для введения лекарства и короткое время удерживания для его всасывания [54]. В этой связи особое внимание уделяется разработке систем доставки из носа в мозг, представляющих собой мукоадгезивные, мукус-проникающие и гелеобразующие системы, способствующих удерживанию или проникновению лекарств через слизистую оболочку. При этом значительную роль при конструировании такого рода систем занимают высокомолекулярные соединения. Наиболее часто используемыми высокомолекулярными соединениями для получения систем доставки лекарств являются полимеры природного (хитозан [55, 56], крахмал [57], микрокристаллическая целлюлоза [58], гиалуроновая кислота [59], декстран [60], альбумин [61], желатин [62]) и синтетического происхождения (полиэфиры, такие как полигликолевая, полимолочная кислота [63] и ее сополимеры, полиангидриды [64], полиэтиленгликоль [65], поликапролактон [66] и др.). Преимуществами природных полимеров является их низкая токсичность и способность к разложению. В отличие от них, при использовании полимеров синтетической природы отмечается возможность регулирования их механических свойств и кинетики распадаемости, что делает их выбор более предпочтительным [66–68].

Мукоадгезивные системы

Мукоадгезивные системы способствуют удерживанию лекарства на слизистой ткани, зачастую путем химических взаимодействий между системой и слизистой оболочкой. Макромолекулы, используемые в мукоадгезии, содержат многочисленные функциональные группы, а также являются гидрофильными [69, 70]. Характерными свойствами полимеров, представляющих интерес для получения мукоадгезивных систем, является наличие либо заряженных групп, либо групп способных к образованию водородных связей, а также высокой молекулярной массы [71, 72].

Известно, что муцины представляют собой гликопротеины, состоящие из белковой цепи с привитыми звеньями олигосахаридов, имеют отрицательный заряд ввиду наличия ионизированных карбоксильных групп и сульфатов сложных эфиров [71]. В этой связи актуальным является использование полимеров катионной природы, которые способны взаимодействовать с отрицательно заряженными цепями, присутствующими в муцинах. Распространенным катионным полисахаридом, обладающим уникальными свойствами, таким как низкая токсичность, биоразлагаемость, мукоадгезивность является хитозан. Данный линейный полимер нерастворим в воде, однако в его химической структуре имеются функциональные группы, которые могут быть использованы для различных химических модификаций [73]. Многообещающим направлением для доставки в мозг является

получение микро- и наночастиц на основе хитозана, что способствует прохождению лекарств и терапевтических агентов через слизистую оболочку носа и обеспечивает защиту от действия протеолитических ферментов [74]. В частности, для доставки в мозг методом ионного гелеобразования были получены наночастицы хитозана с включенным лекарством – прамипексолом, применяющимся для лечения болезни Паркинсона. В экспериментах *ex vivo* было показано, что через 24 часа через слизистую носа козы из наночастиц с хитозаном диффундирует около 83 % лекарственного вещества. В экспериментах с определением содержания уровня дофамина в гомогенате головного мозга крыс было обнаружено наибольшее содержание уровня дофамина при интраназальном введении прамипексола в составе наночастиц с хитозаном по сравнению с интраназальным введением раствора прамипексола и пероральном приемом таблеток [75].

Лекарственное средство с нейрорепрессивной активностью «Рisperидон», используемое при лечении шизофрении, было загружено в наночастицы с хитозаном, полученные методом ионного гелеобразования, и исследована их перспективность при интраназальной доставке в мозг. В результате эффективность мукоадгезии наночастиц с хитозаном составила 72,1 %, данный показатель с загруженным рisperидоном был 68,9 %. Последующие исследования *in vivo* также показали увеличение эффективности доставки лекарства в мозг при его интраназальном введении в составе наночастиц с хитозаном по сравнению с контрольными образцами [76].

Примерами катионных синтетических полимеров, проявляющих мукоадгезивные свойства, являются высокомолекулярные соединения метакрилатной структуры с третично-амино и четвертично-аммониевыми функциональными группами [77].

Мукоадгезивные свойства также проявляют и анионные полимеры, при определенных кислых значениях pH, ввиду возможного связывания протонированных карбоксильных групп водородными связями с муцином [78].

Недавние исследования также показали проявление мукоадгезивных свойств интерполиэлектrolитных комплексов, образованных путем взаимодействия химических комплементарных поликатионов и полианионов, для интраназальной доставки лекарственных средств в мозг, эффективность которых доказана в экспериментах на изолированной слизистой ткани носа овец и на поведенческой модели «катаlepsia» у крыс [79].

Увеличение мукоадгезивных свойств полимеров при конструировании систем доставки лекарств может быть также достигнуто путем конъюгирования к ним различных функциональных групп, таких как тиолы, малеимиды, акрилаты метакрилаты, катехолы

и т. д. [80]. В частности, возможно получение тиомеров, которые образуются с помощью присоединения молекул тиольных групп к полимерам. Тиомеры проявляют улучшенные мукоадгезивные характеристики в результате образования ковалентных связей с муцином [81]. Например, были проведены исследования назального введения геля на основе поликарбофилцистеин/глутатион для доставки гормона роста человека. Результаты исследования проницаемости на свежесрезанной ткани носа крупного рогатого скота продемонстрировали трехкратное увеличение показателя при использовании геля поликарбофилцистеин/глутатион по сравнению с контролем – поликарбофилом. Результаты фармакокинетических исследований на крысах показали максимальную концентрацию в плазме гормона роста при интраназальном введении модифицированного геля поликарбофилцистеин/глутатион ($114,8 \pm 6,3$ мМЕ/мл) по сравнению с поликарбофилом ($10,3 \pm 3,7$ мМЕ/мл) и физиологическим раствором ($17,5 \pm 2,9$ мМЕ/мл), при этом время наступления максимальной концентрации для всех образцов было одинаково [82].

Аналогично тиомерам ковалентные связи с муцинами способны образовывать акрилаты, метакрилаты, малеимиды, катехолы и некоторые другие группы [80]. Имеются исследования о проведении химической модификации катионного терполимера Eudragit® EPO путем акрилоилирования. В результате на изолированной слизистой ткани носа овец наблюдалось удерживание около $3,19 \pm 1,40$ % Eudragit® EPO, что связано с его катионной природой, и $6,34 \pm 1,01$ % и $10,89 \pm 3,48$ % акрилоилированного производного терполимера, благодаря введению акрилоильных групп [83]. Функциональные группы – малеимиды, характеризуются высокой реакционной способностью и селективностью к цистеину, что нашло подтверждение в исследованиях по конструированию малеимид-содержащих наногелей [84], липосом [85] и наночастиц [86].

Таким образом, использование мукоадгезивных полимеров и улучшение их мукоадгезивных характеристик являются одним из перспективных путей конструирования систем для интраназальной доставки лекарственных средств и терапевтических агентов.

Мукус-проникающие системы

Эффективность доставки интраназальных систем может быть достигнута с помощью улучшения проникновения лекарств через назальную слизь – мукус. Несомненно, одним из наиболее часто используемых подходов является получение микро- и наночастиц, покрытых полиэтиленгликолем (ПЭГ). ПЭГ характеризуется биосовместимостью, антигенностью, отсутствием токсичности и инертностью к слизистой ткани. Данный полимер образует «опуш-

ку» на частицах, которая способствует проникновению и обеспечивает защиту от действия протеолитических ферментов [65]. Например, нами была проведена химическая модификация полианиона марки Eudragit® L100-55 с помощью процесса ПЭГилирования. Затем с участием модифицированного полианиона были получены поликомплексы Eudragit® EPO/ПЭГилированный L100-55 в виде наночастиц с последующим включением модельного лекарственного средства – галоперидола. На изображениях, полученных с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, наблюдалась «опушка» из ПЭГа в образце Eudragit® EPO/ПЭГилированный L100-55 по сравнению с Eudragit® EPO/L100-55. Более того, исследование мукоадгезии на изолированной слизистой ткани носа овец показали более быстрое смывание поликомплексных наночастиц с участием ПЭГилированного аниона с поверхности слизистой ткани. Фармакологические исследования на крысах продемонстрировали более раннее наступление эффекта «катаlepsии» при интраназальном введении поликомплексных наночастиц Eudragit® EPO/ПЭГилированный L100-55/галоперидол по сравнению с Eudragit® EPO/L100-55/галоперидол и раствором галоперидола. Время нахождения в состоянии катаlepsии на 10-й минуте эксперимента составило 178 ± 5 сек при введении наночастиц Eudragit® EPO/ПЭГилированный L100-55/галоперидол и 59 ± 49 сек при использовании Eudragit® EPO/L100-55/галоперидол. Полученные результаты, по всей вероятности, связаны с более быстрым проникновением поликомплексных наночастиц EPO/ПЭГилированный L100-55/галоперидол через мукус благодаря наличию «опушки» из ПЭГ [79] (рисунок 3).

Фармакокинетические исследования при интраназальном введении ПЭГилированных наночастиц полилактида с включенным лекарственным средством с противовирусной активностью зидовудином показали увеличение биодоступности вдвое по сравнению с непэгилированными наночастицами полилактида с зидовудином [87]. Интраназальное введение ПЭГилированного трансформирующего фактора роста (TGF- α) продемонстрировало увеличение пролиферации нервных клеток в поврежденном мозге и улучшение поведенческого ответа у экспериментальных животных [88].

Многообещающей альтернативой для облегчения проникновения систем доставки лекарств через мукус, аналогично ПЭГ, является функционализация частиц с помощью поли(2-оксазолинов), поливинилового спирта, и других, что было показано на разных слизистых оболочках организма [89].

Для улучшения всасывания гидрофильных соединений через носовую полость возможно также использование муколитических средств в комбинации с неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ). Например, композиции на основе N-ацетил-1-цистеина и полиоксиэтилен лаурилового эфира показали увеличение биодоступности при интраназальном введении [90].

Мукус-проникающие системы представляют собой значительный интерес в интраназальной доставке лекарственных средств, поскольку способны преодолеть такие ограничительные барьеры для использования, как наличие протеолитических ферментов, мукоцилиарного клиренса и плохой проницаемости гидрофильных соединений, и перспективность их использования уже продемонстрирована в исследованиях на животных.

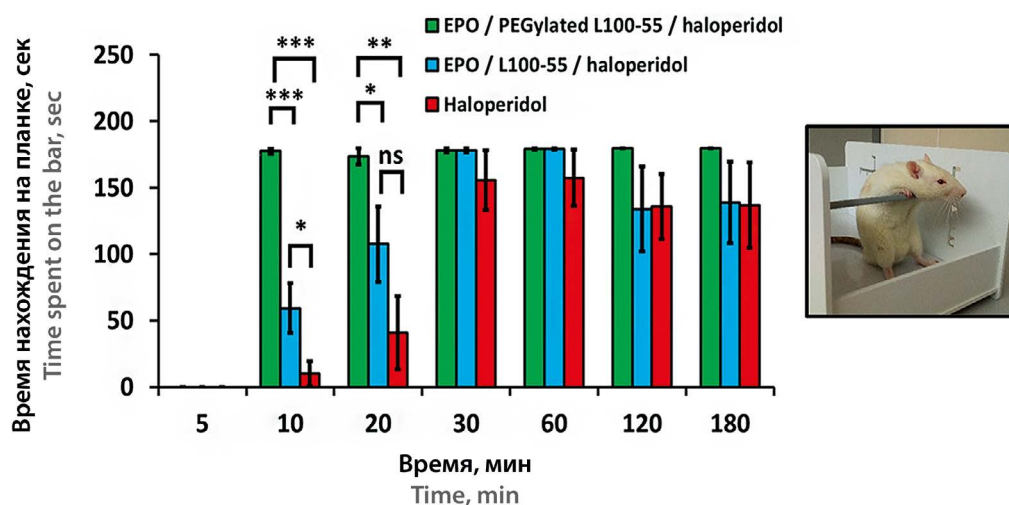


Рисунок 3. Тест на катаlepsию у крыс, вызванную интраназальным введением галоперидола, EPO/L100-55/галоперидол и EPO/ПЭГилированный L100-55/галоперидол ($n = 6$, $P < 0,05$). Перепечатано из [79] с разрешения Elsevier

Figure 3. Catalepsy test in rats by intranasal administration of haloperidol, EPO/L100-55/haloperidol and EPO/PEGylated L100-55/haloperidol ($n = 6$, $P < 0.05$). Reprinted from [79] with permission from Elsevier

Гелеобразующие системы

Особую роль в конструировании интраназальных систем доставки лекарств отводится гелеобразующим системам ввиду высокой эффективности, облегчению всасывания, поддержке постоянной концентрации лекарства, медленному и непрерывному его высвобождению, и увеличению времени удерживания на слизистой оболочке носовой полости [91]. Одним из актуальных подходов при этом является использование гелеобразования *in situ*, реагирующего на раздражители. Данный вид гелей на первом этапе представляет собой раствор, в котором в дальнейшем в ответ на воздействие pH, термические или ионные изменения, электрический сигнал или свет происходит фазовый переход от золя к гелю [92]. В зависимости от химического или физического воздействия для стимуляции фазового перехода различают термо-, pH-, ионообратимые и другие системы.

Термообратимые системы представляют значительный интерес для интраназальной доставки и представлены полимерами как природного (хитозан, этил(гидроксиэтил)целлюлоза), так и синтетического происхождения (полоксамер). Важным аспектом при этом является диапазон используемой температуры, который варьируется от 25 до 37 °C, при других значениях возможно раннее или позднее гелеобразование [93]. В частности, для образования такого рода систем возможно использование хитозана. Термообратимые биогели на основе хитозан/глицерофосфат и хитозан/глицерофосфат/ПЭГ были конструированы для интраназальной доставки антидепрессанта – доксепина. В результате композиции демонстрировали увеличение высвобождения лекарства в слизистой носа до 8 часов, хорошую мукоадгезию и увеличение времени активности на антидепрессивной модели «поведенческое отчаяние» у мышей [94]. Среди полимеров синтетического происхождения широкое распространение получили полоксамеры, представляющие собой триблок-сополимеры, состоящие из центрального более гидрофобного блока полипропиленгликоля и более гидрофильных блоков полиэтиленгликоля [95]. Анионные и катионные липидные наноструктурированные липидные носители, с включенным в состав противопаркинсоническим средством ропиниролом гидрохлоридом на основе *in situ* геля с участием полоксамера 407, были исследованы для интраназальной доставки лекарства в головной мозг [96]. Время высвобождения ропинирола гидрохлорида из *in situ* гелей составило 8 часов, при этом концентрация высвободившегося лекарства для катионных липидных наноструктурированных носителей составила 89,4 %, для анионных – 100 %. При использовании анионных и катионных липидных наноструктурированных носителей и раствора лекарства в буфере наблюдалось уменьшение времени высвобождения (6 и 2 часа соответственно). Результаты исследования токсичности показали умеренное воспаление сли-

зистой носа при использовании катионных липидных наноструктурированных носителей и необратимое воспаление при введении анионных, в то время как данный эффект отсутствовал у образцов с гелевым составом. Фармакокинетические исследования на крысах продемонстрировали сохранение концентрации ропинирола гидрохлорида в головном мозге при интраназальном введении раствора в течение одного часа, в то время как при использовании катионных и анионных липидных наноструктурированных носителей *in situ* гелей данный показатель увеличен до 6 часов. Время достижения максимальной концентрации в мозге при внутривенном введении лекарства составило 7 минут, при интраназальном – 8 минут. Однако в случае интраназального введения катионных и анионных липидных наноструктурированных носителей *in situ* гелей отмечается его сокращение до 3 и 4 минут соответственно.

К ионообратимым системам относится геллан, представляющий собой анионный полисахарид. Возможное конструирование гелей *in situ* с участием геллана связано с фазовым переходом в присутствии ионов Ca^{2+} , имеющимся в большом количестве в физиологических жидкостях, в частности, в носовой полости. Так, имеются данные об использовании геллана для получения геля *in situ* для интраназальной доставки скополамина как средства для профилактики «морской болезни». Полученный гель является биосовместимым, а исследования на крысах показали снижение эффекта «укачивания» по сравнению с пероральным и подкожным введением [97].

Среди pH-обратимых систем значительную роль занимает сетчатый полимер, представляющий редкосшитую полиакриловую кислоту, под названием карбопол (Carbopol®). С использованием карбопола *in situ* был получен ниосомальный гель *in situ* для интраназальной доставки в мозг лекарственного средства с анксиолитической активностью буспирона. В результате при использовании ниосомального геля наблюдалось увеличение проницаемости буспирона через слизистую носа овцы по сравнению с простой гелевой композицией с буспионом, и составило 83,49 и 60 % соответственно [98].

Несомненно, перспективным подходом является также комбинация представленных выше полимеров, в частности получение *in situ* геля на основе карбопола или комбинации – полоксамер/циклодекстрин/хитозан для конструирования эффективных композиций для интраназальной доставки напрямую из носа в головной мозг [99, 100].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неврологические расстройства являются одними из наиболее распространенных заболеваний, регистрируемых у населения. При этом терапия заболеваний мозга ограничена ввиду наличия ГЭБ. Одним из путей повышения эффективности фармакотера-

пии является использование интраназального способа введения, устанавливающего прямую связь между внешней средой и ЦНС, благодаря особенностям строения носовой полости. В этой связи многообещающим направлением в терапии неврологических расстройств является разработка интраназальных систем доставки лекарств. При этом эффективность доставки лекарственных средств и терапевтических агентов в головной мозг может быть достигнута путем использования мукоадгезивных, мукус-проникающих и гелеобразующих систем и/или путем их комбинаций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Crowe T. P., Greenlee M. H. W., Kanthasamy A. G., Hsu W. H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*. 2018;195:44–52. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.12.025.
2. Brown R. C., Lockwood A. H., Sonawane B. R. Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(9):1250–1256. DOI: 10.1289/ehp.7567.
3. Patel A., Surti N., Mahajan A. Intranasal drug delivery: Novel delivery route for effective management of neurological disorders. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;52:130–137. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.04.017.
4. Nguyen T. T., Nguyen T. T. D., Nguyen T. K. O., Vo T. K., Vo V. G. Advances in developing therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;139:111623. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111623.
5. Tolosa E., Garrido A., Scholz S. W., Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2021;20(5):385–397. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2.
6. Wright G. E. B., Black H. F., Collins J. A., Gall-Duncan T., Caron N. S., Pearson C. E., Hayden M. R. Interrupting sequence variants and age of onset in Huntington's disease: clinical implications and emerging therapies. *The Lancet Neurology*. 2020;19(11):930–939. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30343-4.
7. Schuchman E. H., Desnick R. J. Types A and B Niemann-Pick disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017;120(1–2):27–33. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.12.008.
8. Deramecourt V., Slade J. Y., Oakley A. E., Perry R. H., Ince P. G., Mourage C.-A., Kalaria R. N. Staging and natural history of cerebrovascular pathology in dementia. *Neurology*. 2012;78(14):1043–1050. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31824e8e7f.
9. O'Brien J. T., Erkinjuntti T., Reisberg B., Roman G., Sawada T., Pantoni L., Bowler J. V., Ballard C., DeCarli C., Gorelick P. B., Rockwood K., Burns A., Gauthier S., DeKosky S. T. Vascular cognitive impairment. *The Lancet Neurology*. 2003;2(2):89–98. DOI: 10.1016/S1474-4422(03)00305-3.
10. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*. 2010;9(7):689–701. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70104-6.
11. Charidimou A., Pantoni L., Love S. The concept of sporadic cerebral small vessel disease: A road map on key definitions and current concepts. *International Journal of Stroke*. 2016;11(1):6–18. DOI: 10.1177/1747493015607485.
12. Wardlaw J. M., Smith C., Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *The Lancet Neurology*. 2013;12(5):483–497. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70060-7.
13. Seyfried T. N., Kiebish M. A., Marsh J., Shelton L. M., Huyentrui L. C., Mukherjee P. Metabolic management of brain cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2011;1807(6):577–594. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.08.009.
14. Han L., Jiang C. Evolution of blood–brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2306–2325. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.11.023.
15. Abbott N. J., Patabendige A. A. K., Dolman D. E. M., Yusof S. R., Begley D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*. 2010;37(1):13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
16. Lee C. S., Leong K. W. Advances in microphysiological blood–brain barrier (BBB) models towards drug delivery. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;66:78–87. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.06.009.
17. Sharma G., Sharma A. R., Lee S.-S., Bhattacharya M., Nam J.-S., Chakraborty C. Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:360–372. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.056.
18. Costa C. P., Moreira J. N., Sousa Lobo J. M., Silva A. C. Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(4):925–940. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.012.
19. Lochhead J. J., Thorne R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(7):614–628. DOI: 10.1016/j.addr.2011.11.002.
20. Misra A., Kher G. Drug Delivery Systems from Nose to Brain. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012;13(12):2355–2379. DOI: 10.2174/138920112803341752.
21. Costa C., Moreira J. N., Amaral M. H., Sousa Lobo J. M., Silva A. C. Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. *Journal of Controlled Release*. 2019;295:187–200. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.12.049.
22. Arora P., Sharma S., Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2002;7(18):967–975. DOI: 10.1016/S1359-6446(02)02452-2.
23. Grassin-Delyle S., Buenestado A., Naline E., Faisy C., Blouquit-Laye S., Couderc L.-J., Le Guen M., Fischler M., Devillier P. Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;134(3):366–379. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.03.003.
24. Watelet J. B., Van Cauwenberge P. Applied anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. *Allergy*. 1999;54(s57):14–25. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1999.tb04402.x.
25. Erdő F., Bors L. A., Farkas D., Bajza Á., Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*. 2018;143:155–170. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.009.
26. Mittal D., Ali A., Md S., Baboota S., Sahni J. K., Ali J. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. *Drug Delivery*. 2014;21(2):75–86. DOI: 10.3109/10717544.2013.838713.
27. Gänger S., Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):116. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030116.
28. Bourganis V., Kammona O., Alexopoulos A., Kiparissides C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;128:337–362. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.05.009.
29. Ugwoke M. I., Verbeke N., Kinget R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001;53(1):3–21. DOI: 10.1211/0022357011775145.
30. Dhuria S. V., Hanson L. R., Frey W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(4):1654–1673. DOI: 10.1002/jps.21924.
31. Inoue D., Tanaka A., Kimura S., Kiriya A., Katsumi H., Yamamoto A., Ogawara K.-I., Kimura T., Higaki K., Yutani R., Sakane T., Furubayashi T. The relationship between in vivo nasal drug clearance and in vitro nasal mucociliary clearance: Application to the

- prediction of nasal drug absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;117:21–26. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.01.032.
32. Mall M. A. Role of Cilia, Mucus, and Airway Surface Liquid in Mucociliary Dysfunction: Lessons from Mouse Models. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2008;21(1):13–24. DOI: 10.1089/jamp.2007.0659.
33. Lansley A. B. Mucociliary clearance and drug delivery via the respiratory tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993;11:299–327. DOI: 10.1016/0169-409X(93)90014-U.
34. Braiman A., Priel Z. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2008;163(1–3):202–207. DOI: 10.1016/j.resp.2008.05.010.
35. Alsarra I. A., Hamed A. Y., Alanazi F. K., El Maghraby G. M. Vesicular Systems for Intranasal Drug Delivery. In: *Drug Delivery to the Central Nervous System*. Totowa: Humana Press; 2009. P. 175–203. DOI: 10.1007/978-1-60761-529-3_8.
36. Zarshenas M. M., Zargaran A., Müller J., Mohagheghzadeh A. Nasal Drug Delivery in Traditional Persian Medicine. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2013;8(3):144–148. DOI: 10.17795/jjnpp-9990.
37. Chan A. S., Cheung M., Sze S. L., Leung W. W., Shi D. An Herbal Nasal Drop Enhanced Frontal and Anterior Cingulate Cortex Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:543648–543656. DOI: 10.1093/ecam/nep198.
38. Al-Ghananeem A. M., Traboulsi A. A., Dittert L. W., Hussain A. A. Targeted brain delivery of 17 β -estradiol via nasally administered water soluble prodrugs. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(1):40–47. DOI: 10.1208/pt030105.
39. Kao H. D., Traboulsi A., Itoh S., Dittert L., Hussain A. Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of L-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs. *Pharmaceutical Research*. 2000;17(8):978–984. DOI: 10.1023/A:1007583422634.
40. Serralheiro A., Alves G., Fortuna A., Falcão A. Intranasal administration of carbamazepine to mice: A direct delivery pathway for brain targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;60:32–39. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.019.
41. Sin B., Wiafe J., Ciaramella C., Valdez L., Motov S. M. The use of intranasal analgesia for acute pain control in the emergency department: A literature review. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2018;36(2):310–318. DOI: 10.1016/j.ajem.2017.11.043.
42. Agrawal M., Saraf S., Saraf S., Antimisari S. G., Chougule M. B., Shoyele S. A., Alexander A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *Journal of Controlled Release*. 2018;281:139–177. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.05.011.
43. Costantino H. R., Illum L., Brandt G., Johnson P. H., Quay S. C. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;337(1–2):1–24. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.03.025.
44. Keech B., Crowe S., Hocking D. R. Intranasal oxytocin, social cognition and neurodevelopmental disorders: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;87:9–19. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.09.022.
45. Oppong-Damoah A., Zaman R. U., D'Souza M. J., Murnane K. S. Nanoparticle encapsulation increases the brain penetrance and duration of action of intranasal oxytocin. *Hormones and Behavior*. 2019;108:20–29. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2018.12.011.
46. Ozsoy Y., Gungor S., Cevher E. Nasal Delivery of High Molecular Weight Drugs. *Molecules*. 2009;14(9):3754–3779. DOI: 10.3390/molecules14093754.
47. Rhea E. M., Salameh T. S., Banks W. A. Routes for the delivery of insulin to the central nervous system: A comparative review. *Experimental Neurology*. 2019;313:10–15. DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.11.007.
48. Craft S. Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology*. 2012;69(1):29–38. DOI: 10.1001/archneurol.2011.233.
49. Simon K. U., Neto E. W., dos Santos Tramontin N., Canteiro P. B., da Costa Pereira B., Zaccaron R. P., Silveira P. C. L., Muller A. P. Intranasal insulin treatment modulates the neurotropic, inflammatory, and oxidant mechanisms in the cortex and hippocampus in a low-grade inflammation model. *Peptides*. 2020;123:170175. DOI: 10.1016/j.peptides.2019.170175.
50. Salameh T. S., Bullock K. M., Hujoel I. A., Niehoff M. L., Wolden-Hanson T., Kim J., Morley J. E., Farr S. A., Banks W. A. Central Nervous System Delivery of Intranasal Insulin: Mechanisms of Uptake and Effects on Cognition. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;47(3):715–728. DOI: 10.3233/JAD-150307.
51. Yu H., Kim K. Direct nose-to-brain transfer of a growth hormone releasing neuropeptide, hexarelin after intranasal administration to rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;378(1–2):73–79. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.05.057.
52. Ren Z., Zhao Y., Liu J., Ji X., Meng L., Wang T., Sun W., Zhang K., Sang X., Yu Z., Li Y., Feng N., Wang H., Yang D., Yang Z., Ma Y., Gao Y., Xia X. Intramuscular and intranasal immunization with an H7N9 influenza virus-like particle vaccine protects mice against lethal influenza virus challenge. *International Immunopharmacology*. 2018;58:109–116. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.12.020.
53. Bahadur S., Pathak K. Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012;9(1):19–31. DOI: 10.1517/17425247.2012.636801.
54. Pires A., Fortuna A., Alves G., Falcão A. Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for? *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2009;12(3):288–311. DOI: 10.18433/J3NC79.
55. Tian B., Liu Y., Liu J. Chitosan-based nanoscale and non-nanoscale delivery systems for anticancer drugs: A review. *European Polymer Journal*. 2021;154:110533. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110533.
56. Pacheco C., Sousa F., Sarmiento B. Chitosan-based nanomedicine for brain delivery: Where are we heading? *Reactive and Functional Polymers*. 2020;146:104430. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104430.
57. García-González C. A., Uy J. J., Alnaief M., Smirnova I. Preparation of tailor-made starch-based aerogel microspheres by the emulsion-gelation method. *Carbohydrate Polymers*. 2012;88(4):1378–1386. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.023.
58. Kundu D., Banerjee T. Development of microcrystalline cellulose based hydrogels for the in vitro delivery of Cephalaxin. *Heliyon*. 2020;6(1):e03027. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e03027.
59. Vasvani S., Kulkarni P., Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;151:1012–1029. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066.
60. Varshosaz J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012;9(5):509–523. DOI: 10.1517/17425247.2012.673580.
61. Lei C., Liu X.-R., Chen Q.-B., Li Y., Zhou J.-L., Zhou L.-Y., Zou T. Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2021;331:416–433. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.01.033.
62. Jahanban-Esfahlan R., Derakhshankhah H., Haghsheenas B., Masoumi B., Abbasian M., Jaymand M. A bio-inspired magnetic natural hydrogel containing gelatin and alginate as a drug delivery system for cancer chemotherapy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;156:438–445. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.074.
63. Liu S., Qin S., He M., Zhou D., Qin Q., Wang H. Current applications of poly(lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery. *Composites Part B: Engineering*. 2020;199:108238. DOI: 10.1016/j.compositesb.2020.108238.
64. Kipper M. J., Shen E., Determan A., Narasimhan B. Design of an injectable system based on bioerodible polyanhydride microspheres for sustained drug delivery. *Biomaterials*. 2002;23(22):4405–4412. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00181-3.
65. Porfiryeva N. N., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. PEGylated Systems in Pharmaceutics. *Polymer Science, Series C*. 2020;61:62–74. DOI: 10.1134/S181123822001004X.
66. Wei X., Gong C., Gou M., Fu S., Guo Q., Shi S., Luo F., Guo G., Qiu L., Qian Z. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;381(1):1–18. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.07.033.
67. Molavi F., Barzegar-Jalali M., Hamishehkar H. Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes:

- A review on formulation approaches. *Journal of Controlled Release*. 2020;320:265–282. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.01.028.
68. Gunatillake P., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. 2003;5:1–16 DOI: 10.22203/eCM.v005a01.
 69. Bruschi M. L., de Souza Ferreira S. B., Bassi da Silva J. Mucoadhesive and mucus-penetrating polymers for drug delivery. In: *Nanotechnology for Oral Drug Delivery*. Cambridge: Academic Press; 2020. P. 77–141.
 70. Smart J. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(11):1556–1568. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.001.
 71. Khutoryanskiy V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011;11(6):748–764. DOI: 10.1002/mabi.201000388.
 72. Peppas N. A., Buri P. A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *Journal of Controlled Release*. 1985;2:257–275. DOI: 10.1016/0168-3659(85)90050-1.
 73. Zhao D., Yu S., Sun B., Gao Sh., Guo S., Zhao K. Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers*. 2018;10(4):462. DOI: 10.3390/polym10040462.
 74. Sahin A., Yoyen-Ermis D., Caban-Toktas S., Horzum U., Aktas Y., Couvreur P., Esendagli G., Capan Y. Evaluation of brain-targeted chitosan nanoparticles through blood–brain barrier cerebral microvessel endothelial cells. *Journal of Microencapsulation*. 2017;34(7):659–666. DOI: 10.1080/02652048.2017.1375039.
 75. Raj R., Wairkar S., Sridhar V., Gaud R. Pramipexole dihydrochloride loaded chitosan nanoparticles for nose to brain delivery: Development, characterization and in vivo anti-Parkinson activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;109:27–35. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.056.
 76. Rukmangathen R., Yallamalli I. M., Yalavarthi P. R. Formulation and biopharmaceutical evaluation of risperidone-loaded chitosan nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2019;45:1342–1350. DOI: 10.1080/03639045.2019.1619759.
 77. Keely S., Rullay A., Wilson C., Carmichael A., Carrington S., Corfield A., Haddleton D. M., Brayden D. R. In Vitro and ex Vivo Intestinal Tissue Models to Measure Mucoadhesion of Poly (Methacrylate) and N-Trimethylated Chitosan Polymers. *Pharmaceutical Research*. 2005;22:38–39. DOI: 10.1007/s11095-004-9007-1.
 78. Patel M. M., Smart J. D., Nevell T. G., Ewen R. J., Eaton P. J., Tsiouklis J. Mucin/Poly(acrylic acid) Interactions: A Spectroscopic Investigation of Mucoadhesion. *Biomacromolecules*. 2003;4:1184–1190. DOI: 10.1021/bm034028p.
 79. Porfiryeva N. N., Semina I. I., Salakhov I. A., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive and mucus-penetrating interpolyelectrolyte complexes for nose-to-brain drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2021;37:102432. DOI: 10.1016/j.nano.2021.102432.
 80. Brannigan R. P., Khutoryanskiy V. V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromolecular Bioscience*. 2019;19(10):1900194. DOI: 10.1002/mabi.201900194.
 81. Bernkop-Schnürch A. Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57:1569–1582. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.002.
 82. Leitner V. M., Guggi D., Bernkop-Schnürch A. Thiomers in noninvasive polypeptide delivery: In vitro and in vivo characterization of a polycarbophil-cysteine/glutathione gel formulation for human growth hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(7):1682–1691. DOI: 10.1002/jps.20069.
 83. Porfiryeva N. N., Nasibullin S. F., Abdullina S. G., Tukhbatullina I. K., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Acrylated Eudragit® E PO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562:241–248. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.027.
 84. Tonglairoom P., Brannigan R. P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Maleimide-bearing nanogels as novel mucoadhesive materials for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(40):6581–6587. DOI: 10.1039/C6TB02124G.
 85. Kaldybekov D. B., Tonglairoom P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;111:83–90. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.039.
 86. Kaldybekov D. B., Filippov S. K., Radulescu A., Khutoryanskiy V. V. Maleimide-functionalised PLGA-PEG nanoparticles as mucoadhesive carriers for intravesical drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;143:24–34. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.08.007.
 87. Mainardes R. M., Khalil N. M., Gremião M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA–PEG blend nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;395:266–271. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.05.020.
 88. Guerra-Crespo M., Sistos A., Gleason D., Fallon J. H. Intranasal Administration of PEGylated Transforming Growth Factor- α Improves Behavioral Deficits in a Chronic Stroke Model. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2010;19:3–9. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.09.005.
 89. Khutoryanskiy V. V. Beyond PEGylation: Alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;124:140–149. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.015.
 90. Matsuyama T., Morita T., Horikiri Y., Yamahara H., Yoshino H. Enhancement of nasal absorption of large molecular weight compounds by combination of mucolytic agent and nonionic surfactant. *Journal of Controlled Release*. 2006;110(2):347–352. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.09.047.
 91. Agrawal M., Saraf Sh., Saraf S., Dubey S. K., Puri A., Gupta U., Kesharwani P., Ravichandiran V., Kumar P., Naidu V. G. M., Murty U. S., Ajazuddin, Alexander A. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:235–265. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.044.
 92. Karavasili C., Fatouros D. G. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discovery Today*. 2016;21(1):157–166. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.10.016.
 93. Attwood D., Collett J., Tait C. The micellar properties of the poly(oxyethylene) – poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 1985;26:25–33. DOI: 10.1016/0378-5173(85)90197-8.
 94. Naik A., Nair H. Formulation and Evaluation of Thermosensitive Biogels for Nose to Brain Delivery of Doxepin. *BioMed Research International*. 2014;2014:847547. DOI: 10.1155/2014/847547.
 95. Singh R. M., Kumar A., Pathak K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2013;10:115–130. DOI: 10.1517/17425247.2013.746659.
 96. Gabal Y. M., Kamel A. O., Sammour O. A., Elshafee A. H. Effect of surface charge on the brain delivery of nanostructured lipid carriers in situ gels via the nasal route. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;473(1–2):442–457. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.025.
 97. Cao S., Zhang Q., Jiang X. Preparation of ion-activated in situ gel systems of scopolamine hydrobromide and evaluation of its antimitigation sickness efficacy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007;28(4):584–590. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00540.x.
 98. Mathure D., Madan J. R., Gujar K. N., Tupsamundre A., Ranpise H. A., Dua K. Formulation and Evaluation of Niosomal in situ Nasal Gel of a Serotonin Receptor Agonist, Buspirone Hydrochloride for the Brain Delivery via Intranasal Route. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2018;6(1):69–78. DOI: 10.2174/221173850666180130105919.
 99. Rathnam G., Narayanan N., Ilavarasan R. Carbopol-Based Gels for Nasal Delivery of Progesterone. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(4):1078–1082. DOI: 10.1208/s12249-008-9144-7.
 100. Cho H.-J., Balakrishnan P., Park E.-K., Song K.-W., Hong S.-S., Jang T.-Y., Kim K.-S., Chung S.-J., Shim C.-K., Kim D.-D. Poloxamer/Cyclodextrin/Chitosan-Based Thermoreversible Gel for Intranasal Delivery of Fexofenadine Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(2):681–691. DOI: 10.1002/jps.22314.



Международная выставка и форум
по фармацевтике и биотехнологиям

5-7 апреля 2022

Санкт-Петербург, Экспофорум, павильон Н

gotoipheb.com

Санкт-Петербург –
лучшее место
для бизнеса



19

стран



3000+

посетителей



100+

экспонентов



Международное событие для участников фармацевтического и смежных рынков (БАД и здоровое питание)

признанная платформа для встречи с ведущими фармацевтическими компаниями
со всего мира на одной площадке

Поддержка:



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ
ПАЛАТА

СПХФУ

с 1919 года на службе
науки и здоровой жизни



Санкт-Петербургский
государственный химико-
фармацевтический университет

Организатор:



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-129-137>
УДК 577.182.26



Оригинальная статья / Research article

Исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С

А. А. Дранников^{1,2*}, И. С. Ватлин^{1,2}, М. Е. Трусова¹, А. Ди Мартино¹, С. В. Кривошеков³,
А. М. Гурьев³, М. В. Белоусов^{1,3}

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ), 634034, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

² АО «Производственная фармацевтическая компания Обновление», 630096, Россия, г. Новосибирск, ул. Станционная, д. 80

³ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, Россия, Томская обл., г. Томск, Московский тракт, д. 2

*Контактное лицо: Дранников Александр Алексеевич. E-mail: alexdr2037@gmail.com

ORCID: А. А. Дранников – <https://orcid.org/0000-0002-4839-1667>; И. С. Ватлин – <https://orcid.org/0000-0002-7663-7863>; М. Е. Трусова – <https://orcid.org/0000-0002-1761-264X>;
А. Ди Мартино – <https://orcid.org/0000-0002-2664-4483>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; А. М. Гурьев – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 07.10.2021

Статья принята в печать: 19.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Грамицидин С традиционно выпускается в виде таблеток буккальных. В последнее время активно ведутся разработки лекарственной формы грамицидина С в виде спрея. Разработанные составы содержат вспомогательные вещества, которые способствуют солюбилизации малорастворимого антибиотика, однако истинная структура жидких лекарственных форм грамицидина С остается неопределенной.

Цель. Определить коллоидную структуру и биофармацевтические свойства новой антибактериальной композиции грамицидина С.

Материалы и методы. Образец композиции получали в результате самоорганизации с использованием субстанции грамицидина С дигидрохлорида и вспомогательных веществ: пропиленгликоль, полисорбат-80, этиловый спирт, вода очищенная. Для определения качественного состава фаз использовалась рамановская спектроскопия. Параметры частиц в композиции устанавливали с использованием метода динамического рассеяния света. Для сравнительной оценки параметров высвобождения использовали диализ, детектируя концентрацию грамицидина С методом ВЭЖХ. Исследование антимикробного действия проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

Результаты и обсуждение. Проведены структурные исследования композиции грамицидина С: определены размер (5–50 нм), ζ-потенциал частиц (–1,1; +7,9 мВ). Проведена классификация композиции на основании данных о параметрах и особенностях формирования системы, что позволило отнести ее к классу коллоидных растворов. Показано, что исследуемая композиция обладает кинетической устойчивостью. Продемонстрирован характер высвобождения действующего вещества в сравнении с исходной субстанцией и повышенная растворимость антибиотика в воде. Подтверждено усиление антимикробных свойств пептида в составе коллоидного раствора, что связано с синергетическим действием поверхностно-активных веществ и грамицидина С.

Заключение. Установлена коллоидная структура композиции грамицидина С с содержанием 8 мг/мл. Установлено, что включение грамицидина С в состав коллоидного раствора приводит к значительному повышению эффективности антибиотика, что открывает перспективы к уменьшению дозировки действующего вещества и снижению уровня побочных эффектов при разработке лекарственного препарата.

Ключевые слова: грамицидин С, антибиотик, коллоидный раствор, мицеллы

Конфликт интересов. А. А. Дранников является автором патентов RU2659418 и EA036926 на состав исследуемой композиции. И. С. Ватлин, А. А. Дранников заявляют о трудоустройстве в АО «ПФК Обновление». Все остальные авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов.

Вклад авторов. А. А. Дранников, И. С. Ватлин разработали дизайн исследования, провели исследование. А. А. Дранников, С. В. Кривошеков, А. М. Гурьев провели анализ полученных данных. М. В. Белоусов, М. Е. Трусова осуществляли научное руководство исследованием. А. А. Дранников, И. С. Ватлин, С. В. Кривошеков, А. Ди Мартино подготовили текст статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Дранников А. А., Ватлин И. С., Трусова М. Е., Ди Мартино А., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):129–137. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-129-137>

Investigation of Colloidal Structure and Biopharmaceutical Properties of New Antibacterial Composition of Gramicidin S

Aleksandr A. Drannikov^{1,2*}, Ivan S. Vatlin^{1,2}, Marina E. Trusova¹, Antonio Di Martino¹,
Sergei V. Krivoshechekov³, Artem M. Guriev³, Mikhail V. Belousov^{1,3}

¹ The National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenina ave., Tomsk, 634034, Russia

² JSC "Industrial pharmaceutical company Obnovlenie", 80, Stantsionnaya str., Novosibirsk, 630096, Russia

³ Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moskovsky tract, Tomsk, Tomsk region, 634050, Russia

*Corresponding author: Aleksandr A. Drannikov. E-mail: alexdr2037@gmail.com

ORCID: Aleksandr A. Drannikov – <https://orcid.org/0000-0002-4839-1667>; Ivan S. Vatlin – <https://orcid.org/0000-0002-7663-7863>; Marina E. Trusova – <https://orcid.org/0000-0002-1761-264X>;
Antonio Di Martino – <https://orcid.org/0000-0002-2664-4483>; Sergei V. Krivoshechekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;
Artem M. Guriev – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 07.10.2021

Revised: 19.11.2021

Published: 25.11.2021

© Дранников А. А., Ватлин И. С., Трусова М. Е., Ди Мартино А., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В., 2021

© Drannikov A. A., Vatlin I. S., Trusova M. E., Di Martino A., Krivoshechekov S. V., Guriev A. M., Belousov M. V., 2021

Abstract

Introduction. Gramicidin S has been conventionally manufactured as buccal tablets. However, in the past decade, the interest in the development of spray formulations has been growing. Those formulations contain excipients that enhance the solubility of the antibiotic in water solutions. However, the real structure of gramicidin S containing sprays remains unrevealed.

Aim. Investigation of colloidal structure and biopharmaceutical properties of new gramicidin S antibacterial composition.

Materials and methods. The composition sample was obtained using gramicidin S dihydrochloride, propylene glycol, polysorbate-80, ethanol and purified water. Raman spectroscopy has been performed to determine the composition of the phases. Dynamic light scattering analysis was performed to characterize the composition particles. Release of gramicidin S was performed by dialysis method and the concentration was determined by HPLC. The antimicrobial properties were investigated in accordance with the requirements of the XIV edition of the Russian pharmacopoeia.

Results and discussion. Dynamic light scattering analysis results show gramicidin S formulation particles having an average size in solution 5–50 nm and ζ -potential (–1.1: +7.9 mV). Based on the obtained data on the composition properties and formulation parameters it was classified as colloidal solution. The kinetic stability evaluation was performed. We compared the solubility in water and release parameters of the active pharmaceutical ingredient in the native state and in the micelles. The enhancement of the antimicrobial activity of the peptide in the colloidal solution was confirmed and ascribed to the synergic effect gramicidin S – surfactant.

Conclusion. We reported the colloidal type of the composition, that aggregate gramicidin S at a concentration of 8 mg/mL. We found that gramicidin S inclusion into the colloidal solution led to significant efficiency increase, which reveals the potential to reduce the drug dose and side effects level.

Keywords: gramicidin S, antibiotic, colloidal solution, micelles

Conflict of interest. Aleksandr A. Drannikov is an author of patents RU2659418 and EA036926 which reveal the content of the composition. Ivan S. Vatlin, Aleksandr A. Drannikov claim the employment at JSC "PFK Obnovlenie". The rest of the authors claim the absence of obvious and potential conflicts of interest.

Contribution of the authors. Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin developed the experimental design, held the experiment. Aleksandr A. Drannikov, Sergei V. Krivoshchekov, Artem M. Guriev, analyzed the obtained results. Mikhail V. Belousov, Marina E. Trusova were supervisors of this work. Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin, Sergei V. Krivoshchekov, Antonio Di Martino prepared the manuscript. All authors took part in the discussion.

For citation: Drannikov A. A., Vatlin I. S., Trusova M. E., Di Martino A., Krivoshchekov S. V., Guriev A. M., Belousov M. V. Investigation of colloidal structure and biopharmaceutical properties of new antibacterial composition of gramicidin S. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):129–137. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-129-137>

ВВЕДЕНИЕ

Грамицидин С активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых грибов [1], благодаря чему находит применение в терапии заболеваний, вызванных данными микроорганизмами, уже более 70 лет [2].

Однако ввиду отсутствия системной абсорбции пептида по причине его низкой растворимости в воде грамицидин С находит исключительно местное или наружное применение в виде буккальных таблеток или растворов для местного применения [3].

В последнее время активно ведутся разработки лекарственной формы грамицидина С в виде спрея, представляющего собой комбинированный препарат с цетилпиридиния хлоридом и оксibuпрокаином, для лечения заболеваний горла и полости рта [4–7]. Также разработан новый состав антибактериальной композиции грамицидина С на основе системы со-растворителей и поверхностно-активных веществ (ПАВ) с содержанием от 3,2 до 8,0 мг/мл, отличающейся улучшенным профилем безопасности по сравнению с прототипом [8, 9]. Общим свойством разработанных составов является использование ПАВ для повышения растворимости грамицидина С (таблица 1):

Использование ПАВ является одним из наиболее перспективных способов повышения растворимости субстанций в воде по причине возможности образования самоорганизующихся систем [10]. Дополнительная стабильность данных систем обеспечивается путем введения со-растворителей (спирт этиловый, пропиленгликоль или глицерин), обладающих более низким значением гидрофильно-липофильного баланса, за счет образования пленкоподобного комплекса на границе раздела фаз с получением частиц (рисунок 1) [11]:

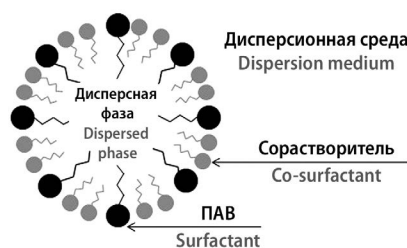


Рисунок 1. Взаимодействие ПАВ и со-растворителей в составе мицелл

Figure 1. Interaction between surfactants and co-solvents in micelles

Таблица 1. Сравнительная таблица составов композиций грамицидина С, содержащих ПАВ

Table 1. Comparative table of gramicidin S compositions containing surfactants

Номер документа Document №	Патент RU 2627423 Patent RU 2627423	Патент RU 2604575 Patent RU 2604575	Патент RU 2604576 Patent RU 2604576	Патент RU 2749902 Patent RU 2749902	Патент RU 2659418 Patent RU 2659418
Состав в масс. % Content in wt. %					
Грамицидин С Gramicidin S	0,027–0,2	0,027–0,033	0,027–0,033	0,002–0,1	0,32–0,80
Оксибупрокаина гидрохлорид Oxybuprocaine hydrochloride	0,067–0,2		0,067–0,083		
Цетилпиридиния хлорид Cetylpyridinium chloride	0,045–0,2	0,045–0,055	0,045–0,055	0,05	
Метилпарабен Methylparaben	0,0736–0,1104	0,0736–0,1104	0,0736–0,1104	0,092	
Пропилпарабен Propylparaben	0,0080–0,0120	0,0080–0,0120	0,0080–0,0120	0,01	
Этанол Ethanol	7,3–10,9	7,3–10,9	7,3–10,9	9,1–9,5	16,00–40,00
Сукралоза Sucralose	0,09–0,11	0,09–0,11	0,09–0,11	0,1	
Глицерол Glycerol	14,9–18,2	14,9–18,2	14,9–18,2	14,3–16,95	
Пропиленгликоль Propylene glycol					10,00–12,00
Ароматизатор мятный Mint aromatizer	0,37–0,44	0,37–0,44	0,37–0,44	0,41	
Лимонной кислоты моногидрат Citric acid monohydrate	0,026–0,032	0,026–0,032	0,026–0,032	0,029	
Натрия цитрат Sodium citrate	0,0099–0,012	0,0099–0,012	0,0099–0,012	0,011	
Полисорбат-80 Polysorbate-80	0,18–0,22	0,18–0,22	0,18–0,22	0,2	0,90–1,10
Вода очищенная Purified water	остальное rest	остальное rest	остальное rest	остальное rest	остальное rest

Таким образом, есть основания полагать, что представленные в литературе композиции являются коллоидными растворами [12].

В настоящей работе приведено исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С, представленной в патенте RU 2659418 [8], в составе которой содержатся грамицидин С в качестве действующего вещества, ПАВ и система сорастворителей субстанции, что исключает влияние других вспомогательных веществ на результаты измерения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали грамицидина С дигидрохлорид (ТУ 9348-023-47509455-2012, АО «ПФК Обновление», Россия), вспомогательные вещества – пропиленгликоль, EP/USP (Ineos Group Ltd, Великобритания), полисорбат-80, EP/NF (Croda International plc, Великобритания), этиловый спирт 95 % (ГФ РФ XIV, ФС.2.1.0036.15) и вода очищенная (ГФ РФ XIV, ФС.2.2.0020.18). Реактивы – хлорная

кислота, ч.д.а. (ООО «Камхимком», Россия), ацетонитрил для хроматографии, ос.ч. (АО «ЛенРеактив», Россия).

Приготовление композиции осуществляли по технологии, описанной в [8, 9]. В 75,0 г воды очищенной при перемешивании последовательно загружали 16,0 г этилового спирта, 10,0 г пропиленгликоля и полисорбат-80 в количестве 1,0 г, перемешивали в течение 10 минут, после чего вносили в полученный раствор грамицидина С дигидрохлорида в количестве 0,8 г. Перемешивали смесь до получения однородного раствора, который затем фильтровали через шприцевой фильтр рейтингом 0,45 мкм (ООО «Глювекс», Россия).

Формирование мицелл подтверждали с использованием метода рамановской спектроскопии на портативном спектрофотометре комбинационного рассеяния Bruker BRAVO Raman spectrometer (Bruker Corporation, Германия) в спектральном диапазоне 3200–400 см⁻¹ с разрешением 10 см⁻¹. Регистрацию спектров для каждого объекта проводили

трижды в целях обеспечения воспроизводимости результата и отсутствия изменения положений полос и интенсивностей.

Определение размера и величины поверхностного заряда частиц коллоидного раствора проводили с использованием метода динамического рассеяния света. Для работы использовали прибор Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания). Образцы анализировали непосредственно после приготовления.

Кинетическую стабильность коллоидного раствора определяли с использованием центрифуги Frontier 5000 FC5706 (Ohaus Corporation, Германия). Образцы подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 15 минут и проверяли на предмет разделения фаз.

Антимикробное действие композиции грамицидина С определяли в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18 ГФ РФ XIV. Определение pH проводили с использованием pH-метра MettlerToledo™ FiveEasyPlus™ FEP20 (Thermo Fisher Scientific Inc, США).

Высвобождение грамицидина С из композиции проводили с использованием следующей последовательности: образец коллоидного раствора в количестве 18,75 мл помещали в полупроницаемую мембрану Spectra/Por® 7 (Thermo Fisher Scientific Inc, США) с размером пор 3,5 кДа, исключая протекание, которую затем помещали в колбу, содержащую 100 мл фосфатного забуференного физиологического раствора с pH=7,4 (ГФ РФ XIV, ОФС.1.3.0003.15). В качестве образца сравнения использовали грамицидина С дигидрохлорид в количестве 150 мг. Образцы перемешивали с использованием орбитального шейкера (ООО «Био-Рус», Россия), периодически отбирая пробы и добавляя в колбу буферный раствор для поддержания объема.

Количественное определение грамицидина С проводили методом ВЭЖХ, в качестве подвижной фазы использовали следующие растворы:

- *Подвижная фаза А.* В 1000 мл воды помещали 6,0 мл хлорной кислоты 70 % и 10,0 мл фосфорной кислоты раствора 25 %, перемешивали, доводили pH полученного раствора до $2,50 \pm 0,05$ с помощью раствора натрия гидроксида 50 %.
- *Подвижная фаза В.* Ацетонитрил для хроматографии.

В качестве испытуемого раствора использовали коллоидный раствор грамицидина С, профильтрованный через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтра. Объем пробы 20 мкл.

В качестве стандартного использовали раствор, который готовили путем растворения навески 25 мг СОП грамицидина С дигидрохлорида (грамицидина С дигидрохлорид, субстанция-порошок, содержание грамицидина С дигидрохлорида 99,9 %, АО «Производственная фармацевтическая компания Обновление», Россия, серия 10719, годен до 31.07.2024) в 25 мл спирта этилового 95 %.

Хроматографические условия: колонка Luna C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, Phenomenex, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 25 °С, детектор УФ, 210 нм. Программа градиента представлена в таблице 2.

Таблица 2. Программа градиента

Table 2. Gradient program

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза В, % Mobile phase B, %
0–7	85	15
7–8	85–50	15–50
8–25	50	50
25–26	50–40	50–60
26–35	40	60
35–65	40–20	60–80
65–70	20	80
70–71	20–85	80–15
71–80	85	15

Содержание грамицидина С дигидрохлорида $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10} \cdot 2HCl$ в одном миллилитре коллоидного раствора в миллиграммах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot 25 \cdot 100}, \quad (1)$$

где S – площадь пика грамицидина С дигидрохлорида на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика грамицидина С дигидрохлорида на хроматограмме раствора стандартного образца; a_0 – навеска стандартного образца грамицидина С дигидрохлорида, в миллиграммах; P – содержание основного вещества в стандартном образце грамицидина С дигидрохлорида, в процентах.

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения структуры композиции грамицидина С дигидрохлорида, ПАВ и сорастворителей приготовлен образец следующего состава (таблица 3):

Таблица 3. Состав коллоидного раствора, содержащего грамицидина С дигидрохлорид, ПАВ и сорастворители

Table 3. Composition of colloidal solution containing gramicidin S hydrochloride, surfactant and co-solubilizers

Наименование компонента Component name	Содержание, г Content, g
Грамицидина С дигидрохлорид Gramicidin S dihydrochloride	0,8
Спирт этиловый, 95 % Ethanol, 95 %	16,0
Пропиленгликоль Propylene glycol	10,0
Полисорбат-80 Polysorbate-80	1,0
Вода очищенная Purified water	до 100 up to 100

Результаты анализа полученной композиции методом рамановской спектроскопии представлены на рисунке 2:

Результаты анализа методом рамановской спектроскопии (рисунок 2, б) демонстрируют наличие характеристических полос спирта этилового и пропиленгликоля в области $1500\text{--}500\text{ см}^{-1}$ [14], что подтверждает присутствие данных веществ в составе дисперсионной среды. В то же время характеристические полосы Амид I грамицидина С, находящиеся в области $1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ [15] и 1000 см^{-1} , обусловленные ароматической структурой D-фенилаланина [16] (рисунок 2, а), отсутствуют, а наличие данных сигналов на спектре высушенной дисперсной фазы (рисунок 2, в) подтверждает факт нахождения действующего вещества в ее составе. При этом на спектре дисперсной фазы дополнительно наблюдаются сигналы 850 и 1100 см^{-1} , характерные для полисорбата-80 [17].

Таким образом, в составе дисперсионной среды полученного коллоидного раствора находятся вода, спирт этиловый и пропиленгликоль, в составе дисперсной фазы – грамицидин С и полисорбат-80.

Полученный образец коллоидного раствора грамицидина С проанализирован с использованием метода динамического рассеяния света для установления наличия частиц, определения их размера и поверхностного заряда (рисунок 3).

Согласно данным (рисунок 3), размер частиц коллоидного раствора находится в пределах от 5 до 50 нм . Значение поверхностного заряда (ζ -потенциала) частиц коллоидного раствора находится в диапазоне $(-1,1; +7,9)\text{ мВ}$.

Малая величина ζ -потенциала в случае разработанной композиции объясняется неионогенной природой ПАВ – полисорбата-80, так как данное вспомогательное вещество обеспечивает устойчивость

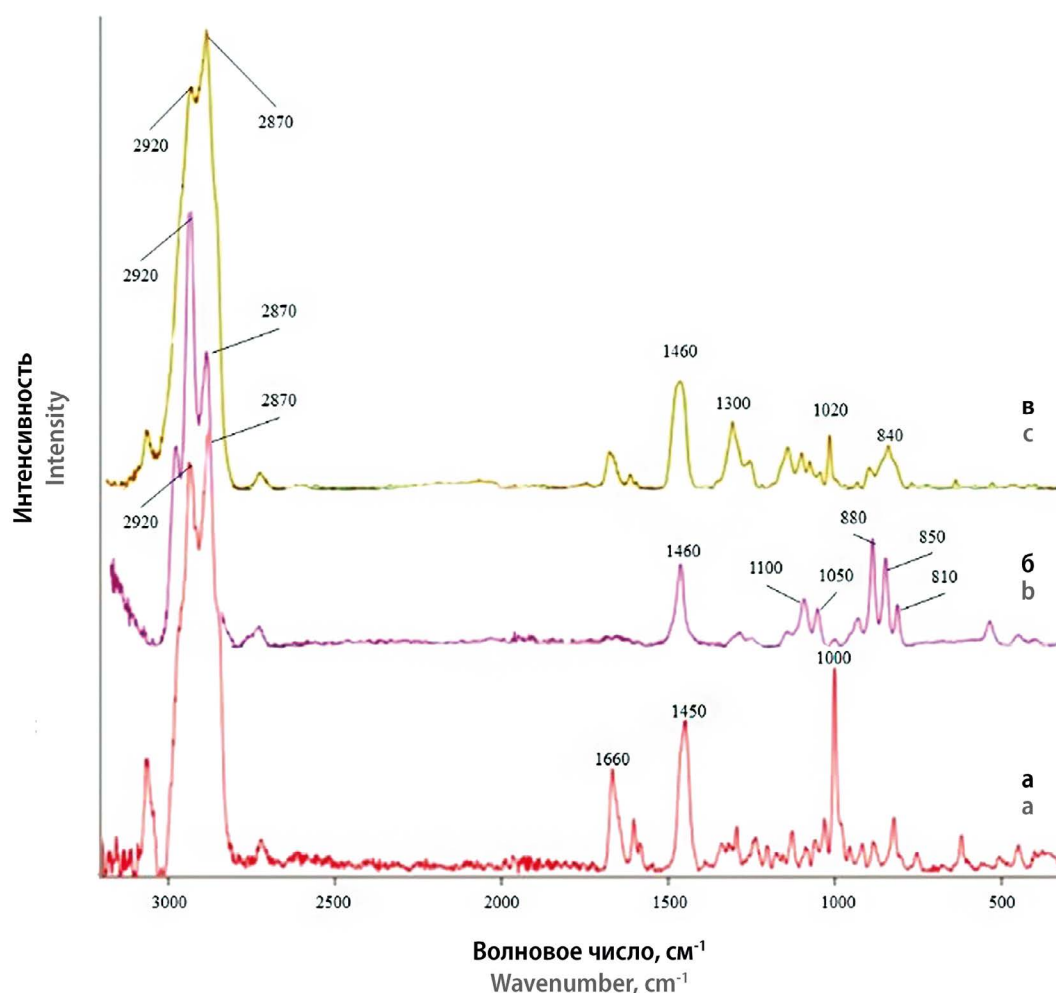


Рисунок 2. Рамановские спектры:

а – грамицидина С дигидрохлорида; б – коллоидного раствора грамицидина С дигидрохлорида; в – дисперсной фазы коллоидного раствора грамицидина С

Figure 2. Raman spectra:

а – gramicidin S dihydrochloride; б – gramicidin S dihydrochloride colloidal solution; в – dispersed phase of gramicidin S colloidal solution

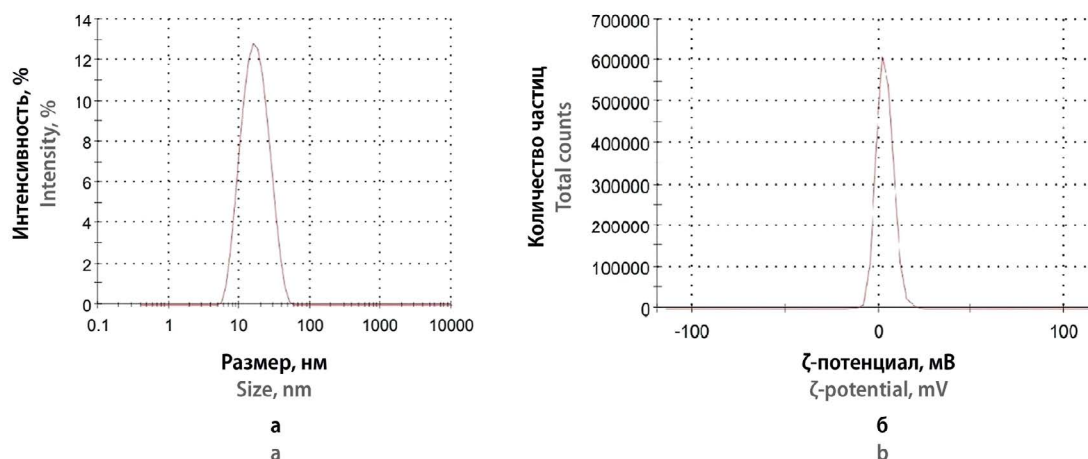


Рисунок 3. Данные исследования коллоидного раствора грамицидина С методом динамического рассеяния света:
а – размер частиц; б – поверхностный заряд

Figure 3. Gramicidin S colloidal solution analysis by dynamic light scattering:
а – particle size; б – surface charge

коллоидного раствора за счет стерических факторов, провоцирующих отталкивание частиц, сохраняя структуру [18]. Отличный от нулевого значения заряд частиц, характерный для мицелл неионогенных ПАВ, свидетельствует о наличии в структуре коллоидного раствора заряженных частиц, среди которых могут быть ионогенные примеси полисорбата-80 в виде свободных жирных кислот [19].

В то же время известно, что мицеллы на основе полисорбата-80, как правило, несут отрицательный заряд [20]. Принимая во внимание химическую природу пропиленгликоля, влияние данного компонента на сдвиг значения заряда в область положительных значений крайне мало, на основании чего можно сделать вывод о роли грамицидина С, обладающего свойствами катиона.

Таким образом, полученное значение ζ -потенциала не противоречит условию стабильности коллоидного раствора, образованного неионогенным ПАВ.

Для оценки стабильности коллоидного раствора проведена оценка его кинетической устойчивости, центрифугирование не привело к оседанию дисперсной фазы, что свидетельствует о кинетической устойчивости композиции.

Для оценки количественного содержания грамицидина С использовали метод ВЭЖХ. Результаты валидационных испытаний разработанной методики представлены в таблице 4:

Результаты исследования кинетики высвобождения грамицидина С из композиции в сравнении с исходной субстанцией представлены на рисунке 4:

Из графиков (рисунок 4) видно, что грамицидин С не обладает растворимостью в среде, имитирующей полость рта, однако в составе композиции антибиотик высвобождается с высокой скоростью (более 75 % за 1 ч), что способно обеспечить более высокое антимикробное действие.

Таблица 4. Результаты валидационных испытаний методики количественного определения грамицидина С

Table 4. Results of validation tests for Gramicidin S quantification method

Параметр Criteria	Результат Result
Специфичность Specificity	На хроматограмме раствора «плацебо» отсутствует пик со временем удерживания грамицидина С (46,38 мин) A peak with the retention time of gramicidin S (46.38 min) is absent on the chromatogram of «placebo»
Линейность Linearity	$R = 0,9997$ Уравнение линейной зависимости $y = 28495,6x - 17781,2$ $R = 0,9997$ Linear dependence equation $y = 28495,6x - 17781,2$
Воспроизводимость Repeatability	RSD = 0,85 %
Внутрилабораторная прецизионность Intra-labprecision	$F_{\text{факт.}} = 2,893$ $F_{\text{табл.}} = 10,967$ $F_{\text{факт.}} = 2,893$ $F_{\text{табл.}} = 10,967$
Правильность Accuracy	$RSD \leq 2,0 \%$ (0,85 %) Отклик 97,5–102,5 % (99,8 %) Доверительный интервал включает значение 100 % (99,8 $\pm$ 0,9) $RSD \leq 2,0 \%$ (0,85 %) Response 97.5–102.5 % (99.8 %) The confidence interval includes meaning 100 % (99.8 $\pm$ 0.9)
Аналитическая область Analytical area	1–140 %

Антимикробную активность композиции исследовали в сравнении с водной суспензией грамицидина С. Результаты данного исследования представлены на рисунке 5.

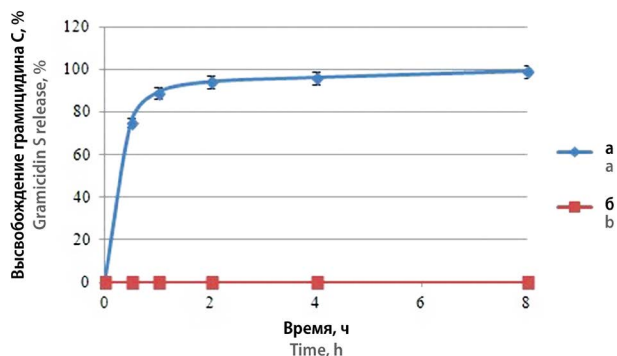


Рисунок 4. Параметры высвобождения грамицидина С из композиции (а) в сравнении с растворением грамицидина С дигидрохлорида (б)

Figure 4. Release parameters of gramicidin S from the composition (a) in comparison with the dissolution of gramicidin S dihydrochloride (b)

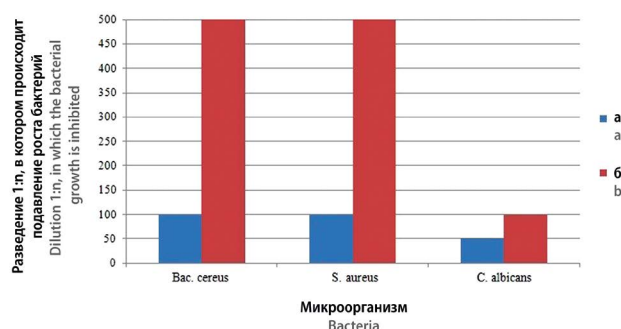


Рисунок 5. Антимикробное действие суспензии (а) и коллоидного раствора (б) грамицидина С дигидрохлорида

Figure 5. Antimicrobial action of gramicidin S hydrochloride in suspension (a) and in colloidal solution (b)

Из результатов, представленных на рисунке 5, следует, что грамицидин С в составе коллоидного раствора проявляет более высокий уровень антимикробной активности в 2–5 раз по отношению к тест-штаммам. Дополнительный вклад в наблюдаемый эффект может внести присутствие ПАВ. Известно, что ПАВ способны повышать активность различных антимикробных агентов за счет влияния на клеточную стенку бактерий [21]. А с учетом того, что грамицидин С имеет схожий механизм активности, оказывая поверхностно-активное воздействие на оболочку микроорганизмов, возможно, наблюдается синергетическое взаимодействие пептида, ПАВ и системы сорастворителей, входящих в состав композиции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования определена структура жидкой композиции, содержащей грамицидин С в системе сорастворителей, что позволило охарактеризовать ее как коллоидный раствор.

Установлено, что включение грамицидина С в состав мицеллы коллоидного раствора приводит к значительному повышению эффективности антибиотика, что открывает перспективы к уменьшению дозировки действующего вещества и, как следствие, снижению уровня побочных эффектов при применении лекарственного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

- Gause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944;154(3918):703–703. DOI: 10.1038/154703a0.
- Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H., Zaitseva E., Laubscher W. E., van Rensburg W., Behrends J. C., Bechinger B., Hamoen L. W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). DOI: 10.1128/mBio.00802-18.
- Государственный реестр лекарственных средств. Грамицидин С. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%BD&m=mnpn>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Сыров К. К., Нестерук В. В. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний местного применения и способ ее получения и применения. Патент РФ на изобретение № RU 2627423 C1. 08.08.2017. Доступно по: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/627/423/%D0%98%D0%97-02627423-00001/document.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Сыров К. К., Нестерук В. В. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний местного применения и способ ее получения и применения. Патент РФ на изобретение № RU 2604575 C1. 10.12.2016. Доступно по: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/575/DOCUMENT.PDF>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Сыров К. К., Нестерук В. В. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний местного применения и способ ее получения и применения. Патент РФ на изобретение № RU 2604576 C1. 10.12.2016. Доступно по: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/576/DOCUMENT.PDF>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Переверзев А. П. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний. Патент РФ на изобретение № RU 2749902 C2. 18.06.2021. Доступно по: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/749/902/%D0%98%D0%97-02749902-00001/document.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Калустов В. Б., Бирюкова Е. А., Измestьева Е. В., Дранников А. А. Антибактериальная композиция для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ приготовления антибактериальной композиции для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления. Патент РФ на изобретение № RU 2659418 C1. 02.07.2018. Доступно по: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/659/418/%D0%98%D0%97-02659418-00001/document.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Калустов В. Б., Бирюкова Е. А., Измestьева Е. В., Дранников А. А. Антибактериальная композиция для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ приготовления антибактериальной композиции для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления. Евразийский патент на изобретение

- № EA 036926 B1. 15.01.2021. Доступно по: <http://www.eapatis.com/Data/EATXT/eapo2021/PDF/036926.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Solomonov A. V., Marfin Y. S., Romyantsev E. V., Ragozin E., Zahavi T. S., Gellerman G., Tesler A. B., Muench F., Kumagai A., Miyawaki A. Self-assembled micellar clusters based on Triton-X-family surfactants for enhanced solubilization, encapsulation, proteins permeability control, and anticancer drug delivery. *Materials Science and Engineering*. 2019;99:794–804. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.016.
 - Kassem A. A., Mohsen A. M., Ahmed R. S., Essam T. M. Self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;218:219–232. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.02.081.
 - Glatter O., Salentinig S. Inverting structures: From micelles via emulsions to internally self-assembled water and oil continuous nanocarriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2020;49:82–93. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.05.003.
 - Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/276/#zoom=z>. Ссылка активна на 12.11.2021.
 - Le M. L. P., Tran N. A., Ngo H. P. K., Nguyen T. G. Liquid electrolytes based on ionic liquids for lithium-ion batteries. *Journal of Solution Chemistry*. 2015;44(12):2332–2343. DOI: 10.1007/s10953-015-0408-z.
 - Ogawa K., Oshima Y., Etoh T., Kaisyakuji Y., Tojigamori M., Ohno Y., Shiraishi N., Inomata M. Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2021;56(7):1150–1156. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2021.03.040.
 - Zhang L., Yuan W.-L., Zhang Z., Zhang G.-H., Chen H., Zhao N., He L., Tao G.-H. Self-assembly ionic nanofibers derived from amino acid for high-performance particulate matter removal. *Journal of Materials Chemistry A*. 2019;7(9):4619–4625. DOI: 10.1039/c8ta11382c.
 - Mitsutake H., Castro S. R., de Paula E., Poppi R. J., Rutledge D. N., Breitzkreitz M. C. Comparison of different chemometric methods to extract chemical and physical information from Raman images of homogeneous and heterogeneous semi-solid pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;552(1–2): 119–129. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.058.
 - Friedrich R. B., Kann B., Coradini K., Offerhaus H. L., Beck R. C., Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;78:204–213. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.07.018.
 - Espinosa-Olivares M. A., Delgado-Buenrostro N. L., Chirino Y. I., Trejo-Márquez M. A., Pascual-Bustamante S., Ganem-Rondero A. Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: physico-chemical characterization, in vitro release, ex vivo skin penetration, stability and antioxidant activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;155:105533. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105533.
 - Prabhakar K., Afzal S. M., Surender G., Kishan V. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013;3(5):345–353. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.08.001.
 - Guo L., Fang Y., Liang X., Xu Y., Chen J., Li Y., Fang S., Meng Y. Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119939. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119939.
 - Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H., Zaitseva E., Laubscher W. E., van Rensburg W., Behrends J. C., Bechinger B., Hamoen L. W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). DOI: 10.1128/mBio.00802-18.
 - Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv. Gramitsidin S. [State register of medicines. Gramicidin S]. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%BD&m=mnn>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Syrov K. K., Nesteruk V. V. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy mestnogo primeneniya i sposob ee polucheniya i primeneniya* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases of local use and method for its preparation and use]. Patent RUS № 22627423 C1. 08.08.2017. Available at: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/627/423/%D0%98%D0%97-02627423-00001/document.pdf> Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Syrov K. K., Nesteruk V. V. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy mestnogo primeneniya i sposob ee polucheniya i primeneniya* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases of local use and method for its preparation and use]. Patent RUS № 2604575 C1. 10.12.2016. Available at: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/575/DOCUMENT.PDF>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Syrov K. K., Nesteruk V. V. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy mestnogo primeneniya i sposob ee polucheniya i primeneniya* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases of local use and method for its preparation and use]. Patent RUS № 2604576 C1. 10.12.2016. Available at: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/576/DOCUMENT.PDF>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Pereverzev A. P. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases]. Patent RUS № 2749902 C2. 18.06.2021. Available at: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/749/902/%D0%98%D0%97-02749902-00001/document.pdf>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Kalustov V. B., Biryukova E. A., Izmet'eva E. V., Drannikov A. A. *Antibakterial'naya kompozitsiya dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob prigotovleniya antibakterial'noy kompozitsii dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya* [Antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, method of producing an antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, and method of delivering gramicidin C to a site of local inflammation]. Patent RUS № 2659418 C1. 02.07.2018. Available at: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/659/418/%D0%98%D0%97-02659418-00001/document.pdf>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Kalustov V. B., Biryukova E. A., Izmet'eva E. V., Drannikov A. A. *Antibakterial'naya kompozitsiya dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob prigotovleniya antibakterial'noy kompozitsii dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya* [Antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, method of producing an antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, and method of delivering gramicidin C to a site of local inflammation]. Patent EA № 036926 B1. 15.01.2021. Available at: <http://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/659/418/%D0%98%D0%97-02659418-00001/document.pdf>

REFERENCES

- Gause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944;154(3918):703–703. DOI: 10.1038/154703a0.

- eapatis.com/Data/EATXT/eapo2021/PDF/036926.pdf. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
10. Solomonov A. V., Marfin Y. S., Rumyantsev E. V., Ragozin E., Zahavi T. S., Gellerman G., Tesler A. B., Muench F., Kumagai A., Miyawaki A. Self-assembled micellar clusters based on Triton-X-family surfactants for enhanced solubilization, encapsulation, proteins permeability control, and anticancer drug delivery. *Materials Science and Engineering*. 2019;99:794–804. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.016.
11. Kassem A. A., Mohsen A. M., Ahmed R. S., Essam T. M. Self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;218:219–232. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.02.081.
12. Glatzer O., Salentinig S. Inverting structures: From micelles via emulsions to internally self-assembled water and oil continuous nanocarriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2020;49:82–93. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.05.003.
13. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. 14-e izd. OFS.1.1.0012.15. Validatsiya analiticheskikh metodik [State Pharmacopoeia of Russian Federation. 14th ed. OFS.1.1.0012.15. Validation of analytical procedures]. Available at: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/276/#zoom=z>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
14. Le M. L. P., Tran N. A., Ngo H. P. K., Nguyen T. G. Liquid electrolytes based on ionic liquids for lithium-ion batteries. *Journal of Solution Chemistry*, 2015;44(12):2332–2343. DOI: 10.1007/s10953-015-0408-z.
15. Ogawa K., Oshima Y., Etoh T., Kaisyakuji Y., Tojigamori M., Ohno Y., Shiraishi N., Inomata M. Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2021;56(7):1150–1156. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2021.03.040.
16. Zhang L., Yuan W.-L., Zhang Z., Zhang G.-H., Chen H., Zhao N., He L., Tao G.-H. Self-assembly ionic nanofibers derived from amino acid for high-performance particulate matter removal. *Journal of Materials Chemistry A*. 2019;7(9):4619–4625. DOI: 10.1039/c8ta11382c.
17. Mitsutake H., Castro S. R., de Paula E., Poppi R. J., Rutledge D. N., Breitzkreitz M. C. Comparison of different chemometric methods to extract chemical and physical information from Raman images of homogeneous and heterogeneous semi-solid pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;552(1–2): 119–129. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.058.
18. Friedrich R. B., Kann B., Coradini K., Offerhaus H. L., Beck R. C., Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;78:204–213. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.07.018.
19. Espinosa-Olivares M. A., Delgado-Buenrostro N. L., Chirino Y. I., Trejo-Márquez M. A., Pascual-Bustamante S., Ganem-Rondero A. Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: physico-chemical characterization, in vitro release, ex vivo skin penetration, stability and antioxidant activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;155:105533. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105533.
20. Prabhakar K., Afzal S. M., Surender G., Kishan V. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013;3(5):345–353. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.08.001.
21. Guo L., Fang Y., Liang X., Xu Y., Chen J., Li Y., Fang S., Meng Y. Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119939. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119939.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-138-146>
UDC 581.45+581.49 + 582.734.3



Research article / Оригинальная статья

Quantitative Anatomical Characteristics of the Leaf Blades of the Several Species of *Crataegus* L.

Valentina A. Sagaradze^{1*}, Elena Yu. Babaeva¹, Elena I. Kalenikova², Nikolay A. Trusov³, Ekaterina V. Peshchanskaya⁴

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1, Greena str., Moscow, 117216, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 27/1, Lomonosovskiy av., Moscow, 119192, Russia

³ Tsytin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences, 4, Botanicheskaya str., Moscow, 127276, Russia

⁴ Skripichinsky Stavropol Botanical Garden, 478, Lenina str., Stavropol, Stavropol Territory, 355028, Russia

*Corresponding author: Valentina A. Sagaradze. E-mail: valentina.sagaradze@yandex.ru

ORCID: Valentina A. Sagaradze – <https://orcid.org/0000-0001-5526-7675>; Elena Yu. Babaeva – <https://orcid.org/0000-0002-4992-6926>;

Elena I. Kalenikova – <https://orcid.org/0000-0003-0068-2788>; Nikolay A. Trusov – <https://orcid.org/0000-0002-5147-6602>;

Ekaterina V. Peshchanskaya – <https://orcid.org/0000-0001-8299-7462>

Received: 13.05.2021

Revised: 07.10.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. The *Crataegus* L. (Hawthorn) is a common herb in numerous Pharmacopoeias. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation provides hawthorn fruits and flowers for medical utilization. With that, the literature data confirms the medical utility of hawthorn leaves since the "leaves" and the "flowers with leaves" have pharmacopoeial status worldwide. Therefore, those are considered as prospective forms of *Crataegus* raw material for Russian pharmaceutical production. However, most species remain poorly pharmacognostically investigated regarding the quantitative microscopic characteristics (the sizes of stomatal apparatus (SA) and epidermal leaf blade (LB) trichomes), which could be substantial for establishing the authenticity of the raw material.

Aim. Examine epidermal anatomy of *Crataegus* spp. Leaf blades (LBs) and perform a comparative study of several quantitative diagnostic features of LBs of hawthorn plants from the sect. *Sanguinea* and the sect. *Crataegus*, growing in diverse regions of the Russian Federation.

Materials and methods. Samples of hawthorn leaves (*C. sanguinea*, *C. maximowiczii*, *C. dahurica*, *C. rhipidophylla*, *C. monogyna* and *C. pallasii*) were collected in natural habitats in Western Siberia (Kemerovo) and in arboreturns of Botanical Gardens (Moscow, Stavropol). Measurements of anatomical structures were carried out using a light microscope accompanied by an ocular micrometre.

Results and discussion. The LB surface phenotypic diversity within hawthorn species and sections was studied. The LBs were described in terms of meterages (longitude and width) of SA, meterages and shape of sedentary multicellular leaf teeth glands. The peculiarities of pubescence and the sizes of simple unicellular non-glandular trichomes were also observed.

Conclusion. The results of quantitative anatomical examination provided the characteristic features determining these elements at the species and section levels. Thus, it may facilitate authentication and quality control of whole or ground *Crataegus* medicinal raw material.

Keywords: *Crataegus* species, leaf blade, leaf teeth glands, stomatal apparatus, simple unicellular trichomes

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

Contribution of the authors. Valentina Sagaradze and Elena Babaeva developed the design of the experiment and performed a comparative microscopic study of epidermal features of leaf blades, processed the data. All authors collected raw materials of *Crataegus* spp. and participated in the discussion of the article, contributed to the final manuscript.

Acknowledgment. We thank R. A. Ufimov, PhD (Austrian Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscapes, Vienna) for the taxonomic identification of the raw material "*Crataegi folium cum flore*" specimens; Yu. V. Zagurskaya, PhD (Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS "Institute of Human Ecology", Kemerovo) for providing the raw material "*Crataegi folium cum flore*" samples.

Funding. This work was supported by the All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, Russia [The state budget Research and Advanced Development "Scientific formation, conservation, study of biocollections" № AAAA-A19-119112590084-5 (0576-2019-0008)].

For citation: Sagaradze V. A., Babaeva E. Yu., Kalenikova E. I., Trusov N. A., Peshchanskaya E. V. Quantitative anatomical characteristics of the leaf blades of the several species of *Crataegus* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):138–146. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-138-146>

Количественные анатомические характеристики листовых пластинок некоторых видов *Crataegus* L.

В. А. Сагарадзе^{1*}, Е. Ю. Бабаева¹, Е. И. Каленикова², Н. А. Трусов³, Е. В. Пещанская⁴

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, улица Грина, д. 7

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), факультет фундаментальной медицины, 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр., д. 27, корп. 1

³ ФГБУН Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, 127276, Россия, г. Москва, Ботаническая ул., д. 4

⁴ ФГБНУ «Ставропольский ботанический сад имени В. В. Скрипчинского», 355028, Россия, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Ленина, д. 478

*Контактное лицо: Сагарадзе Валентина Андреевна. E-mail: valentina.sagaradze@yandex.ru

ORCID: В. А. Сагарадзе – <https://orcid.org/0000-0001-5526-7675>; Е. Ю. Бабаева – <https://orcid.org/0000-0002-4992-6926>; Е. И. Каленикова – <https://orcid.org/0000-0003-0068-2788>;

Н. А. Трусов – <https://orcid.org/0000-0002-5147-6602>; Е. В. Пещанская – <https://orcid.org/0000-0001-8299-7462>.

Статья поступила: 13.05.2021

Статья принята в печать: 07.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

© Sagaradze V. A., Babaeva E. Yu., Kalenikova E. I., Trusov N. A., Peshchanskaya E. V., 2021

© Сагарадзе В. А., Бабаева Е. Ю., Каленикова Е. И., Трусов Н. А., Пещанская Е. В., 2021

Резюме

Введение. Сырье растений рода *Crataegus* L. (Боярышник) включено во многие Фармакопеи мира. Государственная фармакопея Российской Федерации предусматривает использование плодов и цветков боярышника. Вместе с тем, литературные данные подтверждают возможность использования в медицинских целях листьев боярышника, поскольку «листья» и «цветки с листьями» имеют фармакопейный статус во всем мире. Они рассматриваются как перспективные виды сырья боярышника для российского фармацевтического производства. Однако большинство видов остаются плохо изученными в отношении количественных микроскопических характеристик (размеры устьичного аппарата (УА) и трихом эпидермиса листовых пластинок), которые могут иметь большое значение для установления подлинности сырья.

Цель. Изучить анатомическое строение эпидермиса листовых пластинок *Crataegus* spp. и провести сравнительное исследование количественных диагностических признаков листовых пластинок растений боярышника из секции *Sanguineae* и секции *Crataegus*, произрастающих в разных регионах Российской Федерации.

Материалы и методы. Образцы листьев боярышника (*C. sanguinea*, *C. maximowiczii*, *C. dahurica*, *C. rhipidophylla*, *C. monogyna* и *C. pallasii*) были заготовлены в естественных местообитаниях в Западной Сибири (Кемерово) и в дендрариях ботанических садов г. Москвы и г. Ставрополя. Измерения анатомических структур проводились с помощью светового микроскопа с окулярным микрометром.

Результаты и обсуждение. Проведено сравнительное исследование морфолого-анатомического строения листовых пластинок (ЛП) на уровне видов и секции боярышника. Приведены размеры (длина и ширина) для УА, сидячих многоклеточных железок и простых одноклеточных трихом. Описана форма железок и установлено различие на уровне секции. Отмечены особенности опушения.

Заключение. Результаты количественного анатомического исследования позволили выявить характерные отличительные признаки по размерам УА и форме железок в зависимости от вида боярышника и на уровне секций. Таким образом, это может облегчить установление подлинности и контроль качества целого или измельченного лекарственного сырья *Crataegus*.

Ключевые слова: виды *Crataegus*, листовая пластинка, железки на зубцах листа, устьичный аппарат, простые одноклеточные волоски

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

Вклад авторов. В. А. Сагарадзе и Е. Ю. Бабаева разработали план эксперимента и провели сравнительное микроскопическое исследование анатомических признаков листовой пластинки, произвели обработку данных. Все авторы принимали участие в заготовке сырья *Crataegus* spp., а также в обсуждении статьи и подготовке окончательной редакции рукописи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность к. б. н. Р. А. Уфимову (Austrian Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscapes, Vienna) за таксономическую идентификацию образцов; к. б. н. Ю. В. Загурской [Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека), Кемерово] за предоставленный растительный материал «Боярышника цветки с листьями».

Финансирование. Работа поддержана Всероссийским научно-исследовательским институтом лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), Москва, Россия [Государственный бюджет НИОКР «Научное формирование, сохранение, изучение биоколлекций» № АААА-А19-119112590084-5 (0576-2019-0008)].

Для цитирования: Сагарадзе В. А., Бабаева Е. Ю., Каленикова Е. И., Трусов Н. А., Пещанская Е. В. Количественные анатомические характеристики листовых пластинок некоторых видов *Crataegus* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):138–146. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-138-146>

ABBREVIATIONS

EPh – European Pharmacopoeia; LB – leaf blade; MBG – Tsytsin Main Botanical Garden; MRM – Medicinal raw material; RAS – Russian Academy of Sciences; RSPH XIV – The State Pharmacopoeia of the Russian Federation; SA – stomatal apparatus; USP – United States Pharmacopoeia; WHO – World Health Organization.

INTRODUCTION

The herbal preparations of *Crataegus* L. (Hawthorn), family Rosaceae Juss., are well-known regarding the beneficial health properties [1] and widely prescribed as the prevention or concomitant therapy for chronic heart failure of the I-III functional class (New York Heart Association (NYHA) Functional Classification). These are the following indications: coronary heart disease, atrial fibrillation, paroxysmal tachycardia, hypertension, angioneurosis, insomnia and atherosclerosis [2-10].

The complex raw material "hawthorn leaves and flowers" (*Crataegi folium cum flore*) and hawthorn fruits (*Crataegi fructus*) are the most widespread medicinal raw material (MRM) registered in Pharmacopoeias in Europe and

America [3, 11–13]. "Hawthorn leaves" (*Crataegi folium*) are also investigated and utilized in China [14–17]. Moreover, it occurs as an object of study in various researches [18, 19]. In several countries, including Russia, "Hawthorn flowers" is officially approved MRM of hawthorn [20].

The genus *Crataegus* L. estimates approximately 250 species, more than a half of which grow in North America, while the rest grow in the Old World [21]. The genus *Crataegus* is characterized by a complicated taxonomic structure [21, 22]. Several studies displayed that majority of species were united into subgenera and sections based on the morphological features of leaves and fruits. According to literature, five subgenera were distinguished: *Crataegus*, *Sanguineae* Ufimov subgen. nov., *Americanae* El-Gazzar, *Mespilus* (L.) Ufimov & T. A. Dickinson, *Brevispinae* (Beadle) Ufimov & T. A. Dickinson, which mostly coincide with geographical zones [23, 24]. Each subgenus included several sections [21, 22, 24, 25]. Despite great diversity, only a few species are registered in pharmacopoeial monographs. For example, ten hawthorn species and two hybrids are approved for harvesting medicinal plant raw materials in the current State Pharmacopoeia of the Russian Federation the XIVth edition (RSPH

XIV) [20]. At the same time, approximately 40 species of wild hawthorn were found in the eastern regions of forest, forest-steppe and steppe zones of the European and Asian parts of the Russian Federation [26].

The majority of hawthorn species included in the current RSPH XIV belong to the sect. *Crataegus* of the subgen. *Crataegus* [20]. *C. monogyna* Jacq. (also included in Eph and USP) [11, 22], *C. rhipidophylla* Gand., *C. pallasii* Griseb. and other European species and their hybrids are the ordinary representatives of the sect. *Crataegus* [21]. Their growth area covers European countries, the middle zone of the European part of Russia, the Caucasus, Krasnodar and Stavropol Territories and the Crimea [21, 25].

The species from sect. *Sanguineae* Zabel ex C. K. Schneider of the subgen. *Sanguineae* are widespread in the Asian part of the Russian Federation. However, only four species are listed in the RSPH XIV. *C. sanguinea* Pall remains the most extensive representative of the sect. *Sanguineae* [20]. It grows in Siberia, in the east of the European zone of Russia, in Zavolzhye, in the Middle and the South Urals and Altai Territory. *C. dahurica* Koechne ex Schneid. and *C. maximowiczii* C.K. Schneid. grow in Siberia, Amur and Primorye equally belong to the sect. *Sanguineae* [27–30].

Anatomical studies of medicinal products of *Crataegus* spp., especially leaves, are limited, furthermore quantitative microscopic characteristics are usually ungiven. Anatomical diagnostic features of Bashkortostan *C. sanguinea* leaves were studied by S. V. Trofimova [31]. The morphology and anatomy of *C. sanguinea* and *C. monogyna* petioles were described by N. A. Volkova [32]. T. A. Rezanova and S. A. Bakshutov had presented the results of morphological and anatomical investigation of leaves of 20 *Crataegus* spp. collected in Belgorod region during the beginning of fruiting, including three species from the sect. *Sanguineae* and three species from the sect. *Crataegus* [33]. V. Sharipova had investigated the leaf structure of *C. korolkowii* (sect. *Sanguineae*), collected in two different environmental locations [34]. The description of anatomic-morphological examination of leaves, flowers and fruits of the endemic plant *C. almaatensis* Pojark growing Almaty region of the Republic of Kazakhstan was given by E. N. Bekbolatova et al. [35].

Quantitative characterization of anatomical features is substantial for establishing the authenticity of the MRM. The sizes and density of microscopic diagnostic features commonly are unnormalized in microscopy atlases. Therefore, proceeded type of MRM could not be accurately characterized [36]. In some cases, it is necessary to normalize sizes or determine the density of anatomical features [37], considering the plasticity of diagnostic features in different environmental conditions [34, 38–42].

In this connection, the studies of anatomical features of medicinal products of various representatives of the genus *Crataegus* L. have become relevant. We set up a task to carry out the comparative study of some quantitative epidermal features of leaf blades (SA, glands and epidermal non-glandular trichomes) of hawthorn plants

from the sect. *Sanguineae* and the sect. *Crataegus*, growing in diverse regions of the Russian Federation. Accompanying our previous study of flavonoid content in "*Crataegi folia cum flores*" further results can be used to refine the authenticity and quality criteria of the promising medicinal raw material [43].

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The leaves of *C. sanguinea*, *C. maximowiczii*, *C. dahurica*, *C. monogyna*, *C. rhipidophylla* and *C. pallasii* were collected during the mass flowering period in May–early June 2016 in the arboretum of Tsytsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (MBG RAS), Moscow (Central District of the Non-Chernozem Zone), Kemerovo (south of Western Siberia) and the Stavropol Botanical Garden (Central part of the Ciscaucasia). Taxonomic identification of the plants was established by taxonomist R. A. Ufimov, PhD. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of Vascular Plants of the Komarov Botanical Institute of the RAS, Saint-Petersburg (LE) (table 1). The plant material was air-dried and stored at room temperature.

Table 1. The list of hawthorn leaf samples included in the comparative analysis

№ voucher specimens	Species	Location
Section <i>Sanguineae</i> Zabel ex C.K. Schneider		
LE01020969	<i>C. sanguinea</i>	the arboretum of the MBG RAS, Moscow (55°50'21" N, 37°36'03" E)
LE01020943	<i>C. sanguinea</i>	Kemerovo, Kedrovsky coal mine (56°32' N, 86°3' E)
LE01020981	<i>C. dahurica</i>	the arboretum of the MBG RAS, Moscow (55°50'21" N, 37°36'03" E)
LE01020939	<i>C. dahurica</i>	the arboretum of Kuzbass Botanical Garden, Kemerovo (55° 21.2981' 0" N, 86° 5.2388' 0" E)
LE01020970	<i>C. maximowiczii</i>	the arboretum of the MBG RAS, Moscow (55°50'21" N, 37°36'03" E)
LE01020948	<i>C. maximowiczii</i>	Suchaya rechka village, Kemerovo (55°14'21" N, 86°06'56" E)
Section <i>Crataegus</i>		
LE01020972	<i>C. monogyna</i>	the arboretum of the MBG RAS Moscow (55°50'21" N, 37°36'03" E)
LE01020974	<i>C. rhipidophylla</i> *	the arboretum of the MBG RAS Moscow (55°50'21" N, 37°36'03" E)
LE01020976	<i>C. rhipidophylla</i> *	the arboretum of V.V. Skripchinskiy Stavropol Botanical Garden, Stavropol (45° 2.6701' 0" N, 41° 58.1439' 0" E)
LE01020982	<i>C. pallasii</i>	the arboretum of the MBG RAS Moscow (55°50'21" N, 37°36'03" E)

Note. *syn. – *C. curvisepala*.

Microscopy

Microscopic samples of leaf surface were studied. Stem leaves from the middle tier of main shoot were observed. It is known that the number of stomata per surface unit varies within different parts of a

leaf. The sites approaching the average number of stomata are located in the middle third of LB: between ribs and a midrib [44]. Therefore, this site was taken for anatomical investigations and measurements. For *C. sanguinea*, *C. maximowiczii*, *C. dahurica* and *C. rhipidophylla* two specimens per species and for *C. monogyna* and *C. pallasii* one specimens per species were observed. At least 3 individual leaves were used. For each sample 3 measurements were made. Microscopic samples of LB were prepared according to the General Pharmacopoeial Monograph 1.5.3.0003.15 RSPH XIV "Technique of microscopic and microchemical studies of medicinal plant materials and herbal medicines" [45]. The samples were observed under the light Mikmed-1 microscope with AU-12 1.5x binocular (10x eyepiece, WF10x wide-angle eyepiece with a scale, 8x, 10x, 20x, 40x lenses) (Lomo, Russia) and the MSP-1 binocular (Lomo, Russia). Pictures were taken with Fugifilm DIGITAL CAMERA FinePix JX500 (Fugifilm, Japan) and edited in Picasa (ver. 3.9 141.259, Google, USA).

Anatomical diagnostic features were studied according to the requirements of General Pharmacopoeial Monograph 1.5.1.0003.15 "Folia" in RSPH XIV [45]. Measurements of anatomical structures were carried out using an ocular micrometre according to the method described in the General Pharmacopoeial Monograph 1.5.3.0003.15 "Technique of microscopic and microchemical studies of medicinal plant materials and herbal medicines" [45]. The linear size between two most distant points (the cell wall of the periostic epidermal cells), measured horizontally was considered as the length of the SA [46]. The linear size across the cell walls of the periosteum cells of the epidermis, measured horizontally was considered as the width of SA [47].

Statistical analysis

Statistical calculations were carried out using Excel (ver. 2016, Microsoft, USA) and RStudio for Windows (ver. Desktop 1.4.1103, RStudio PBC, USA) software package. The normality of all data was analyzed by Shapiro-Wilk's test. All normally distributed data were analyzed using ANOVA with post-hoc Tukey HSD Test for intergroup comparisons. In other cases, Nemenyi non-parametric all-pairs comparison test for Kruskal-type ranked data was applied. Comparisons between two sections were performed using Mann-Whitney U-test. Data on figures are presented as medians and 25th-, 75th-percentiles. Data in tables are presented as means±SD. Student t-test with Bonferroni correction for multiple comparisons was applied for two-group comparison if the data were normally distributed; $p \leq 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaves of observed species were hypostomatic. Stomata were elongated, rarely rounded, surrounded by 5–7 periostic cells (anomocytic type of SA). The striations of cuticle were folding around stomata (figure 1).



Figure 1. Surface section of *Crataegus monogyna* leaf. Scale bar – 100 μm

The stomatal length varied from 20.1 to 50.3 μm and width varied from 10.1 to 36.9 among investigated species. Significant differences regarding SA width among the sect. *Sanguineae* representatives were detected neither among distinct species nor within the species harvested in different environmental conditions. However, *C. dahurica* from Kemerovo had significantly greater SA longitude than other studied accessions and *C. dahurica* from Moscow as well. The *C. rhipidophylla* and *C. pallasii* (the sect. *Crataegus*) had the equivalent SAs meterages and pretended to have significantly wider and longer SAs than *C. monogyna* SA (table 2).

Comparing the data on both sections, we found that the sect. *Crataegus* representatives had significantly greater SA meterages (figure 2).

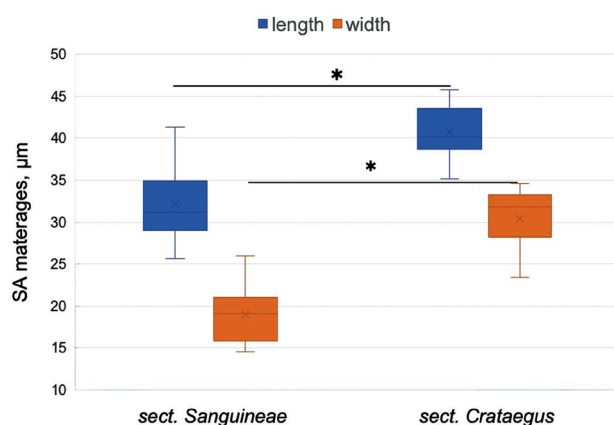


Figure 2. The meterages of stomatal apparatus in the sect. *Sanguineae* and the sect. *Crataegus*. The data are presented in the form of a median, mean and percentiles (25 %, 75 %). *U-test, $p \leq 0.05$

Multicellular marginal glandular trichomes were typical for *Crataegus* species LBs. Similar trichomes were previously described for several genera in fami-

Table 2. Morphometric parameters of SA on hawthorn leaf surface, μm

Section	Sanguineae											
Species	C. sanguinea (Kemerovo)		C. sanguinea (Moscow)		C. maximowiczii (Kemerovo)		C. maximowiczii (Moscow)		C. dahurica (Kemerovo)		C. dahurica (Moscow)	
	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width
min	26.8	13.4	23.5	13.4	20.1	10.1	20.1	10.8	23.5	10.1	23.5	10.1
max	36.9	30.2	40.2	30.2	40.2	26.8	40.2	33.5	50.3	30.2	40.2	26.8
average	31.4 ± 1.6 ^a	21.8 ± 3.8	29.1 ± 2.4 ^a	19.4 ± 3.4	28.6 ± 1.9 ^a	17.6 ± 2.2	31.5 ± 3.3 ^a	18.2 ± 2.2	40.4 ± 1.9 ^b	21.1 ± 0.9	32.4 ± 2.5 ^a	17.1 ± 1.3
Section	Crataegus											
Species	C. monogyna (Moscow)		C. rhipidophylla (Moscow)		C. rhipidophylla (Stavropol)		C. rhipidophylla (Stavropol)		C. pallasii (Moscow)		C. pallasii (Moscow)	
	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width
min	26.8	16.8	33.5	23.5	33.5	26.8	33.5	33.5	26.8	33.5	33.5	13.4
max	50.3	33.5	50.3	36.9	50.3	36.9	50.3	50.3	36.9	50.3	50.3	40.2
average	37.4 ± 1.6 ^a	25.2 ± 1.9 ^b	40.8 ± 2.1 ^a	31.2 ± 1.5 ^c	43.5 ± 1.9 ^a	33.2 ± 1.1 ^c	41.3 ± 1.6 ^a					32.2 ± 1.4 ^c

Note. ^{abc} ANOVA, Tukey HSD grouping, $p \leq 0.05$.

ly Rosaceae: *Prunus* L., *Malus* L., etc. [48]. Chin and co-authors had presented the classification of multicellular glands and had described their structural variants for several species from the genus *Prunus* [49]. According to that classification, we had observed leaf teeth glands located near vascular zones. The epidermis of the gland was formed by palisade cells. The hypodermal zone was intensely brown coloured (figure 3).

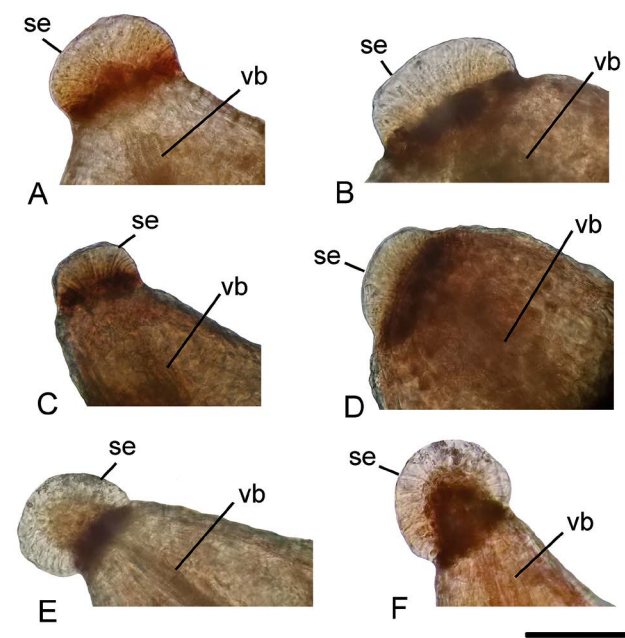


Figure 3. Leaf teeth gland of *Crataegus*.
A – *Crataegus sanguinea* (Moscow); B – *Crataegus sanguinea* (Kemerovo); C – *Crataegus dahurica* (Moscow); D – *Crataegus dahurica* (Kemerovo); E – *Crataegus rhipidophylla* (Moscow); F – *Crataegus rhipidophylla* (Stavropol). vb – vascular bundle; se – secretory epidermis. Scale bar – 100 μm

The secretion of glandular trichomes of flowering plants naturally includes various classes of secondary metabolites. Terpenoids are the most studied [50]. Phenolic compounds, particularly flavonoids, are considered the most common components in glands secretion of woody plants [51, 52]. The chemical composition of the leaf teeth glands exudation in hawthorns is scarce [53].

The sizes of leaf teeth glands in *C. sanguinea*, *C. dahurica*, and *C. maximowiczii* (sect. *Sanguineae*) from two regions: Moscow (central region of the Non-Chernozem Zone) and Kemerovo (south of Western Siberia) were studied comparatively. *C. dahurica* (Kemerovo) had the widest leaf teeth glands in comparison to *C. maximowiczii* from the same location and the species from Moscow. *C. sanguinea* (Kemerovo) could be significantly distinguished from Moscow specimens: *C. dahurica* and *C. maximowiczii* ($p \leq 0.05$), *C. sanguinea* ($p \leq 0.1$) (table 3).

The specimens from Moscow and *C. maximowiczii* from Kemerovo had equally wide leaf teeth glands. Regarding the longitude of leaf teeth glands: within the

Table 3. Morphometric parameters of hawthorn leaf teeth glands, μm

Section	Sanguineae											
	C. sanguinea (Kemerovo)		C. sanguinea (Moscow)		C. maximowiczii (Kemerovo)		C. maximowiczii (Moscow)		C. dahurica (Kemerovo)		C. dahurica (Moscow)	
Species	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width
min	73.7	107.2	30.2	67.0	33.5	93.8	23.5	63.7	63.7	120.6	30.2	50.6
max	87.1	187.6	83.8	167.5	83.8	144.1	50.3	97.2	194.3	251.3	137.4	120.6
average	79.9 $\pm$ 3.8 ^a	144.1 $\pm$ 11.8 ^{b,c*}	49.2 $\pm$ 3.6 ^a	104.5 $\pm$ 11.5 ^{c,d}	52.4 $\pm$ 8.6 ^a	117.2 $\pm$ 10.4 ^{c,d}	35.2 $\pm$ 1.4	82.4 $\pm$ 1.8 ^d	126.1 $\pm$ 17.5	171.5 $\pm$ 16.2	50.9 $\pm$ 14.4 ^a	83.0 $\pm$ 10.6 ^d
Section	Crataegus											
	C. monogyna (Moscow)		C. rhipidophylla (Moscow)		C. rhipidophylla (Stavropol)		C. rhipidophylla (Stavropol)		C. pallasii (Moscow)		C. pallasii (Moscow)	
Species	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width	length	width
min	36.9	36.9	26.8	60.3	30.2	67.0	30.2	67.0	33.5	36.9	33.5	36.9
max	80.4	107.2	53.6	93.8	70.4	130.65	70.4	130.65	73.7	97.1	73.7	97.1
average	55.6 $\pm$ 3.3	67.7 $\pm$ 1.9	40.4 $\pm$ 3.3	79.4 $\pm$ 1.9	50.0 $\pm$ 2.2	72.5 $\pm$ 2.2	50.0 $\pm$ 2.2	72.5 $\pm$ 2.2	53.5 $\pm$ 3.3	81.9 $\pm$ 1.9	53.5 $\pm$ 3.3	81.9 $\pm$ 1.9

Note. ^aNemenyi All-Pairs Rank Comparison Test, $p \leq 0.05$; ^{b,c,d}ANOVA, Tukey HSD grouping, $p \leq 0.05$; ^{e,f} – $p \leq 0.1$.

same harvesting location, significant differences among species were not found in both sections, except difference between *C. maximowiczii* (Moscow) and Siberian *C. dahurica*.

Within the sect. *Sanguineae*, the length/width ratio of the leaf teeth gland varied among species. *C. sanguinea* had 0.47–0.55 length/width ratio, while *C. maximowiczii* samples demonstrated comparable results: 0.43–0.45. Thus, the glands were twice as wide as long. The length/width ratio of *C. dahurica* leaf teeth glands varied: the sample from Kemerovo – 0.72 and the sample from Moscow – 0.67. So, the shape of these glands was close to cubic (in the plane – square).

Among species within the sect. *Crataegus* and individual species collected in different regions (e.g., *C. rhipidophylla* from Moscow and Stavropol) significant differences in leaf teeth glands meterage were unfound. Unlike the sect. *Sanguineae*, hawthorns from the sect. *Crataegus* mainly had a spherical (in the plane – rounded) leaf teeth gland shape with 0.78 ratio – *C. monogyna*. The length/width ratio of 0.65 was *C. pallasii* and 0.67 – *C. rhipidophylla* (Stavropol). The *C. rhipidophylla* from the arboretum of the MBG RAS (Moscow) is distinguished by more elongated glands – 0.51 length/width ratio. The sizes of leaf teeth glands of specimens collected in the arboretum of the MBG RAS (Moscow) were comparable in both sections (table 3). With that, sect. *Sanguineae* plants had significantly wider leaf teeth glands (figure 4). Our data is consistent with the results obtained in the Belgorod region [33].

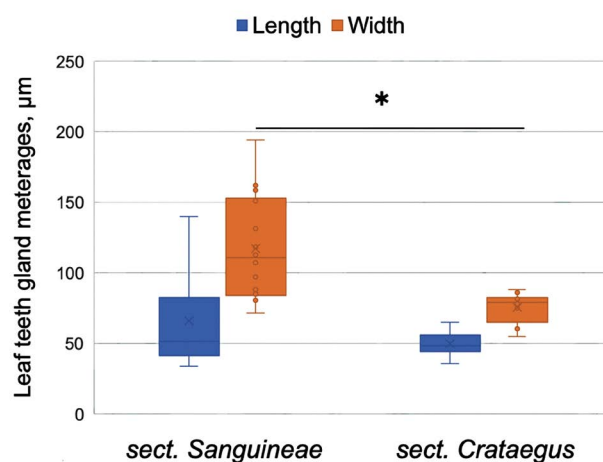


Figure 4. Leaf teeth meterages in the sect. *Sanguineae* and the sect. *Crataegus*. The data are presented in the form of a median, mean and percentiles (25 %, 75 %). *U-test, $p \leq 0.05$

According to the Pharmacopoeias and WHO Monographs on medicinal plants, epidermal non-glandular trichomes on *Crataegus* leaf blade surface are considered as a diagnostic feature [2, 11–13, 16, 20]. Observed leaf blades were covered with simple unicellular trichomes of 117–660 μm long (table 4), excluding the *C. rhipido-*

Table 4. Morphometric parameters of epidermal simple unicellular trichomes on hawthorn leaves, μm

Section	Sanguineae																
Species	C. sanguinea (Kemerovo)			C. sanguinea (Moscow)			C. maximowiczii (Kemerovo)			C. maximowiczii (Moscow)			C. dahurica (Kemerovo)			C. dahurica (Moscow)	
	length	width		length	width		length	width		length	width		length	width		length	width
Adaxial side																	
min	197.7	13.4		211.1	13.4		144.1	13.4		154.1	16.8		-	-		-	-
max	579.6	26.8		428.8	26.8		412.1	30.1		247.9	30.2		-	-		-	-
average	384.4 ± 21.5	20.6 ± 0.4 ^g		296.8 ± 18.7 ^a	23.5 ± 0.7 ^e		227.5 ± 28.1 ^b	20.9 ± 3.4 ^b		199.8 ± 5.7 ^c	24.2 ± 1.1 ^f		-	-		-	-
Abaxial side																	
min	426.4	13.4		311.6	13.4		117.6	13.4		264.7	16.8		284.8	16.3		268.0	16.8
max	688.8	26.8		582.2	23.5		304.9	30.2		616.4	30.2		552.8	26.8		660.0	30.2
average	535.1 ± 6.0	19.5 ± 1.0 ^g		456.0 ± 51.6 ^a	18.7 ± 1.0 ^e		320.9 ± 12.9 ^b	20.4 ± 1.0 ^b		385.9 ± 39.1 ^c	23.0 ± 2.0 ^f		445.8 ± 89.2	21.1 ± 4.2		512.7 ± 8.1	20.2 ± 0.9
Section	Crataegus																
Species	C. monogyna (Moscow)			C. rhipidophylla (Moscow)			C. rhipidophylla (Stavropol)			C. pallasii (Moscow)							
	length	width		length	width		length	width		length	width		length	width		length	width
Adaxial side																	
min	264.7	16.8		-	-					227.8	10.1		244.6	16.8		16.8	
max	603.0	36.9		-	-					495.8	23.5		462.3	26.8		26.8	
average	407.3 ± 28.1 ^d	27.1 ± 5.2 ^j		-	-					313.3 ± 71.0 ^e	20.4 ± 3.2 ^k		327.5 ± 26.7 ^f	22.1 ± 0.9 ⁱ		22.1 ± 0.9 ⁱ	
Abaxial side																	
min	304.9	16.8		-	-					258.0	10.1		254.6	10.1		10.1	
max	649.9	33.5		-	-					495.8	23.5		492.5	26.8		26.8	
average	442.8 ± 54.1 ^d	26.1 ± 4.6 ^j		-	-					357.4 ± 63.7 ^e	19.1 ± 2.3 ^k		363.1 ± 18.8 ^f	21.1 ± 0.7 ⁱ		21.1 ± 0.7 ⁱ	

Note. ^{a-l} Bonferroni t-test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

phylla (arboretum of the MBG RAS, Moscow), which was glabrous. Single trichomes were detected on the abaxial side of *C. dahurica* LB. The other species were pubescent on both sides. It was noted that the trichomes on the abaxial side of LB of *C. sanguinea* were longer in comparison to those on the adaxial side. The other specimens were pubescent with trichomes of equal longitude on both sides. Nearby the midribs simple unicellular trichomes commonly arranged in clusters (figure 5). The pubescence features (type, length and density of the trichomes) on the petiole were similar to the pubescence of the LB.

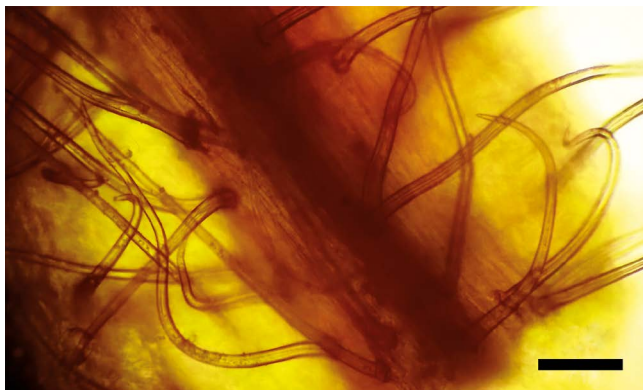


Figure 5. Surface section of *Crataegus maximowiczii* leaf. Groups of simple unicellular trichomes near the midrib. Scale bar – 100 µm

CONCLUSIONS

The anatomical study of SA and trichomes on leaf epidermis of *C. sanguinea*, *C. dahurica*, *C. maximowiczii*, *C. monogyna*, *C. rhipidophylla*, *C. pallasii* LBs was performed. Microscopy has revealed characteristic features: hypostomatic leaf type, anomocytic SA, multicellular glands, simple unicellular hairs. Studied species had comparable sizes of LBs' SA within both sections. With that, plants from the sect. *Crataegus* from both regions demonstrated significantly greater sizes of SA in comparison with the sect. *Sanguineae* plants.

Both sections did not demonstrate significant differences in leaf teeth glands longitude among species collected within the same location. Comparing the sections concerning leaf teeth glands length the difference was also unfound. Furthermore, significantly wider leaf teeth glands differentiated *C. dahurica* and *C. sanguinea* (Kemerovo) from the other species of the sect. *Sanguineae*, collected in Moscow. The sections *Sanguineae* and *Crataegus* were also distinguished by the leaf teeth gland shape: cuboid and spherical, respectively. With that, in the sect. *Sanguineae* plants had significantly wider leaf teeth glands.

The studied species also had various features of pubescence of LB and the sizes of simple unicellular non-glandular trichomes. The species of both sections were pubescent with trichomes of equal length on both sides,

except Siberian *C. sanguinea*, which had longer trichomes on the adaxial side. Within both sections, non-glandular trichomes assembled in clusters in the region of the midrib.

Identified distinctive features could be applicable for authentication of the MRM of hawthorn ("leaves" or "flowers with leaves") harvested in different geographical zones. Possible variations of studied parameters on species and sections should be taken into account during the quality control process of hawthorn MRM since it will help screen out the herbal adulterants.

REFERENCES

1. Cicero A. F. G., Colletti A. Nutraceuticals and dietary supplements to improve quality of life and outcomes in heart failure patients. *Current Pharmaceutical Design*. 2017;23(8):1265–1272. DOI: 10.2174/1381612823666170124120518.
2. WHO monographs on selected medicinal plants. V. 2. Geneva: World Health Organization; 2002. 358 p.
3. Blumenthal M., Hall T., Goldberg A., Kunz T., Dinda K., Brinckmann J., Wollschlaeger B., editors. The ABC clinical guide to herbs. Austin: American Botanical Council; 2003. 480 p.
4. Zick S. M., Gillespie B., Aaronson K. D. The effect of *Crataegus oxyanthas* special extract WS 1442 on clinical progression in patients with mild to moderate symptoms of heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2008;10(6):587–593. DOI: 10.1016/j.ejheart.2008.04.008.
5. Fürst R., Zirrgiebel U., Totzke F., Zahler S., Vollmar A. M., Koch E. The *Crataegus* extract WS® 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR-β. *Atherosclerosis*. 2010;211(2):409–417. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.003.
6. Holubarsch C. J. F., Colucci W. S., Eha J. Benefit-Risk Assessment of *Crataegus* Extract WS 1442: An Evidence-Based Review. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2018;18(1):25–36. DOI: 10.1007/s40256-017-0249-9.
7. Ngoc P. C., Leclercq L., Rossi J.-C., Desvignes I., Hertzog J., Fabiano-Tixier A.-S., Chemat F., Schmitt-Kopplin P., Cottet H. Optimizing water-based extraction of bioactive principles of hawthorn: from experimental laboratory research to homemade preparations. *Molecules*. 2019;24(23):4422. DOI: 10.3390/molecules24234420.
8. Cheng F., Jiang W., Xiong X., Chen J., Xiong Yu., Li Y. Ethanol extract of chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruit reduces inflammation and oxidative stress in rats with doxorubicin-induced chronic heart failure. *Medical Science Monitor*. 2020;26:e926654. DOI: 10.12659/MSM.926654.
9. Cloud A., Vilcins D., McEwen B. The effect of hawthorn (*Crataegus* spp.) on blood pressure: a systematic review. *Advances in Integrative Medicine*. 2020;7(3):167–175. DOI: 10.1016/j.aimed.2019.09.002.
10. Wu M., Liu L., Xing Ya., Yang S., Li H., Cao Y. Roles and mechanisms of hawthorn and its extracts on atherosclerosis: a review. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11. DOI: 10.3389/fphar.2020.00118.
11. Hawthorn leaf and flower. In: European Pharmacopoeia 6.0. Strasbourg: Council of Europe; 2008. 2035–2036 p. Available at: <http://www.uspbpep.com/ep60/hawthorn%20leaf%20and%20flower%201432e.pdf>. Accessed: 01.04.2020.
12. Farmacopeia Brasileira. 5th ed. V. 2. Brasília: ANVISA; 2010. 836 p. (In Port.)
13. United States Pharmacopoeia 33. National Formulary 28, Second Supplement, Reissue: Hawthorn Leaf and Flower. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention; 2012. 3238 p.
14. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 8th ed. V. 1. Chinese Pharmacopoeia Commission. Beijing: People's Medical Publishing House; 2005. 970 p.
15. Gao P.-Y., Li L.-Z., Liu K.-C., Sun C., Sun X., Wu Y.-N., Song S.-J. Natural terpenoid glycosides with *in vitro/vivo* antithrombotic profiles from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *RSC Advances*. 2017;7(76):48466–48474. DOI: 10.1039/C7RA10768D.

16. Hu Y.-H., Peng L.-Q., Wang Q.-Y., Yang J., Dong X., Wang S.-L., Cao J., Liu F.-M. Ecofriendly microwave-assisted reaction and extraction of bioactive compounds from hawthorn leaf. *Phytochemical Analysis*. 2019;30(6):710–719. DOI: 10.1002/pca.2849.
17. Shi Ya., Kong X., Yin H., Zhang W., Wang W. Effect of hawthorn leaf flavonoids in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary syndrome in rats. *Pathobiology*. 2019;86(2–3):102–110. DOI: 10.1159/000493895.
18. Alirezalu A., Salehi P., Ahmadi N., Sonboli A., Aceto S., Maleki H. H., Ayyari M. Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of Iran. *International Journal of Food Properties*. 2018;21(1):452–470. DOI: 10.1080/10942912.2018.1446146.
19. Lund J. A., Brown P. N., Shipley P. R. Quantification of North American and European *Crataegus* flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Fitoterapia*. 2020;143:104537. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104537.
20. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Federal Electronic Medical Library Electronic Resource: The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. V. 4. Moscow: State Pharmacopoeia of the Russian Federation; 2018. Available from: <http://www.femb.ru/feml>. Accessed: 01.04.2020. (In Russ.)
21. Christensen K. I. Revision of *Crataegus* sect. *Crataegus* and notho-sect. *Crataegineae* (Rosaceae-Maloideae) in the Old World. V. 35. Laramie: American Society of Plant Taxonomists; 1992. 199 p.
22. Ufimov R. A. Notes on the genus *Crataegus* L. (Rosaceae). *Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences*. 2013;44:113–125. (In Russ.)
23. Ufimov R. A., Dickinson T. A. Infrageneric nomenclature adjustments in *Crataegus* L. (Maleae, Rosaceae). *Phytologia*. 2020;102(3):177–199.
24. El-Gazzar A. The taxonomic significance of leaf morphology in *Crataegus* (Rosaceae). *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. 1980;101(4):457–469.
25. Christensen K. I., Zieliński J. Notes on the genus *Crataegus* (Rosaceae-Pyreae) in Southern Europe, the Crimea and Western Asia. *Nordic Journal of Botany*. 2008;26(5–6):344–360. DOI: 10.1111/j.1756-1051.2008.00330.x.
26. Vafin R. V., Putenikhin V. P. *Crataegus*: Introduction and biological features. Moscow: Nauka; 2003. 224 p. (In Russ.)
27. Solov'yeva N. M., Kotelova N. V. Hawthorn, Moscow: Agropromizdat; 1986. 72 p. (In Russ.)
28. Zyryanova O. A., Yaborov V. T., Abaimov A. P., Koike T., Sasa K., Terazawa M. Problems in the maintenance and sustainable use of forest resources in Priamurye in the Russian Far East. *Eurasian Journal of Forest Research*. 2005;8(1):53–64.
29. Muhametova S. V. Hawthorn species of Asian flora in the middle Volga region. *Problems on Botany in Southern Siberia and Mongolia*. 2013;12:129–132. (In Russ.)
30. Lobanov A. I., Kirienko M. A. Seasonal development peculiarities of the genus *Crataegus* L. plants in the Krasnoyarsk forest steppe conditions. *Bulletin of KrasGAU* 2015;2:118–123. (In Russ.)
31. Trofimova S. V. Pharmacognostic study of Redhaw Hawthorn leaves *Crataegus sanguinea* Pall. of flora of Bashkortostan. PhD thesis. Ufa: Bashkir State Medical University; 2014. 22 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01005551745>. Accessed: 01.04.2020.
32. Volkova N. A. Comparative study of the petiole features of hawthorn redhaw (*Crataegus sanguinea* Pall.) and hawthorn white-thorn (*Crataegus monogyna* Jacq.). In: The II-nd Interuniversity scientific-practical conference "Pharmaceutical botany: modernity and prospects"; 2017 Oct 7; Samara: Samara State Medical University; 2017. 159–171 p. (In Russ.)
33. Rezanova T. A., Bakshutov S. A. Adaptive features of the leaf surface in species of the genus *Crataegus* L. (Rosaceae Juss.). *Belgorod University Scientific bulletin. Natural Sciences*. 2009;9(104),(15/2):21–29. (In Russ.)
34. Sharipova V. Comparative analysis the structure of the leaf *Crataegus korolkowii* L. (Rosaceae Juss.) Common in two different environmental conditions. *Journal of Novel Applied Sciences*. 2019;8(2):30–34.
35. Bekbolatova E. N., Kurbatova N. V., Sakipova Z. B., Ibragimova L. N., Ibragimova L. N., Alpysbayeva S. I., Kabdenova A. T., Kuku-la-Koch W., Boylan F. Macroscopic and microscopic diagnostic features of the potential herbal drug *Crataegus almaatensis* Pojark endemic in Kazakhstan. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;14(2):39–50.
36. Tretyak A. N., Doroshkevich E. I. Prospects for the development of a microscopy atlas of medicinal plant materials. In: I-st International scientific-practical conference "Medicinal plants: biodiversity, technology, application"; 2014 June 5–6. Grodno, Belarus. Grodno: Grodno State Agrarian University; 2014. 186–189 p. (In Russ.)
37. Golubeva I. C., Potanina O. G., Sorokina A. A. Quantitative characteristics of the anatomical and diagnostic signs of sweatweed (*Althaea officinalis*) roots. *Farmacy*. 2008;3:25–26. (In Russ.)
38. Flores A. S., de Souza Costa E., Dias G. B. Foliar anatomy of *Rhynchosia* spp. (Leguminosae, *Papilionoideae*) from Roraima state, northern Brazilian Amazon. *Acta Amazonica*. 2019;49(1):28–35. DOI: 10.1590/1809-4392201801691.
39. Gago P., Conejero G., Martínez M. C., This P., Verdeil J. L. Comparative anatomy and morphology of the leaves of grenache noir and syrah grapevine cultivars. *South African Journal for Enology and Viticulture*. 2019;40(2):132–140. DOI: 10.21548/40-2-3031.
40. Lemos V. O. T., Lucena E. M. P., de Lucena E. M. P., Bonilla O. H., Edson-Chaves B. Ecological anatomy of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (Myrtaceae) in the restinga region, state of Ceará. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2019;41(6):e-503. DOI: 10.1590/0100-29452019503.
41. da Silva P. M. F., Silva E. O., de Sousa Chaves Rêgo M., de Resende Castro L. M., Siqueira-Silva A. I. Anatomical and histochemical characterization of *Dipteryx odorata* and *Taralea oppositifolia*, two native Amazonian species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019;29(4):425–433. DOI: 10.1016/j.bjrp.2019.05.004.
42. Lemos V. O. T., de Lucena E. M. P., Bonilla O. H., Edson-Chaves B., Freitas M. A. Anatomia ecológica foliar de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. na Restinga Cearense. *Ciencia Florestal*. 2020;30(2):307–322. DOI: 10.5902/1980509830997. (In Port.)
43. Sagaradze V. A., Babaeva E. Yu., Ufimov R. A., Trusov N. A., Kalenikova E. I. Study of the variability of rutin, vitexin, hyperoside, quercetin in "Crataegi folium cum flore" of hawthorn (*Crataegus* L.) species from Russian flora. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2019;15:100217. DOI: 10.1016/j.jarmap.2019.100217.
44. Miroslavov E. A. Structure and function of the epidermis of the leaf of angiosperms. Leningrad: Nauka; 1974. 120 p. (In Russ.)
45. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Federal Electronic Medical Library Electronic Resource: The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. V. 2. Moscow: State Pharmacopoeia of the Russian Federation; 2018. Available at: <http://www.femb.ru/feml>. Accessed: 01.04.2020.
46. Linguistics Institute of the RAS, Dictionary of the Russian language In 4 volumes, 4th ed. V. 1. Moscow: Polygraph Resources; 1999. 702 p. (In Russ.)
47. Linguistics Institute of the RAS. Dictionary of the Russian language In 4 volumes, 4th ed. V. 4. Moscow: Polygraph Resources; 1999. 797 p. (In Russ.)
48. Kiryanova V. A., Babaeva E. U. Comparison of anatomical characteristics of leaves and flowers of *Crataegus* and some species of Rosaceae family. *Modern Phytomorphology*. 2014;6:123–124.
49. Chin S.-W., Lutz S., Wen J., Potter D. The bitter and the sweet: inference of homology and evolution of leaf glands in *Prunus* (Rosaceae) through anatomy, micromorphology, and ancestral-character state reconstruction. *International Journal of Plant Sciences*. 2013;174(1):27–46. DOI: 10.1086/668219.
50. Roshchina V. V., Roshchina V. D. The excretory function of higher plants. Moscow: Nauka; 1989. 213 p. (In Russ.)
51. Beckman C. N., Mueller W. C., McHardy W. E. Localization of stored phenols in plant hairs. *Physiological Plant Pathology*. 1972;2(1): 69–74.
52. Kelsey R. G., Reynolds C. W., Rodriguez E. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: Rodriguez E., Healey P. L., Mehtha I., eds. *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. New York: Plenum Press; 1984. P. 187–241.
53. Feucht W., Treutter D. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: Inderjit K., Dakshini M. M., Foy C. L., eds. *Principles and Practice in Plant Ecology. Allelochemical Interactions*. Boca Raton: CRC Press; 1999. P. 307–338.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-147-153>
УДК 615.322; 574.24



Оригинальная статья / Research article

Особенности накопления восстанавливающих сахаров цветками липы сердцевидной (*Tilia cordata* Miller, 1768) в Воронежской области

Н. А. Дьякова*, А. И. Сливкин, С. П. Гапонов, Е. А. Бобина, Л. А. Шишорина

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

*Контактное лицо: Дьякова Нина Алексеевна. E-mail: Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Н. А. Дьякова – <https://orcid.org/0000-0002-0766-3881>; А. И. Сливкин – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>; С. П. Гапонов – <https://orcid.org/0000-0001-8430-5693>; Е. А. Бобина – <https://orcid.org/0000-0002-4836-2401>; Л. А. Шишорина – <https://orcid.org/0000-0002-1297-5126>.

Статья поступила: 11.05.2020

Статья принята в печать: 19.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Цветки липы сердцевидной применяются преимущественно в виде водных извлечений, а фармакологический эффект обусловлен водорастворимыми соединениями, основу которых составляют полисахариды. Изучение особенностей накопления данной группы соединений является актуальным.

Цель. Изучение особенностей накопления суммы восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной, заготовленных в агро- и урбоценозах Воронежской области.

Материалы и методы. В Воронежском регионе была выбрана 51 точка заготовки цветков липы сердцевидной. Объектом исследования стали цветки липы сердцевидной – широко распространенных на территории России – вида листопадных деревьев. Для изучения содержания суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу – основной группы биологически активных веществ в цветках липы сердцевидной – использовали методику ФС.2.5.0024.15 «Липы цветки». Для подробного изучения влияния основных поллютантов (тяжелых металлов и мышьяка) на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной анализировали коэффициенты корреляции.

Результаты и обсуждение. Все проанализированное лекарственное растительное сырье признано доброкачественным по содержанию восстанавливающих сахаров. Образцы, собранные на контрольных (заповедных) территориях, содержат восстанавливающие сахара в количестве от 13,31 до 16,89 %, что в 6–8 раз больше нижнего числового показателя, установленного нормативной документацией. В лекарственном растительном сырье, собранном в агроценозах региона, концентрация восстанавливающих сахаров варьирует от 6,12 до 16,68 %, что в 3–8 раз больше приведенного в фармакопейной статье числового показателя. Для цветков липы сердцевидной, заготовленных в урбоценозах региона, показано более низкое содержание восстанавливающих сахаров, чем для образцов заповедных зон (2,35–13,49 %). Рассчитанные значения коэффициентов корреляции показали заметное отрицательное влияние кадмия, хрома, кобальта, меди, цинка, а также умеренное отрицательное влияние свинца и ртути на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной.

Заключение. Наиболее низкое содержание восстанавливающих сахаров выявлено в образцах, заготовленных на улицах крупных городов области, вдоль автомобильных трасс и железной дороги. Это позволяет сделать вывод об отрицательном влиянии антропогенной нагрузки на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной. Вероятно, прочные комплексы сахаридов с тяжелыми металлами затрудняют реакцию с комплексообразователем, используемым в методике количественного определения восстанавливающих сахаров. Это выражается некоторым ложным снижением показателей содержания биологически активных веществ.

Ключевые слова: Воронежская область, липа сердцевидная, восстанавливающие сахара, глюкоза, агроценозы, урбоценозы

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

Вклад авторов. А. И. Сливкин, Н. А. Дьякова, С. П. Гапонов придумали и разработали эксперимент. Н. А. Дьякова, Е. А. Бобина, Л. А. Шишорина провели фармакогностическое исследование и расчеты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Бобина Е. А., Шишорина Л. А. Особенности накопления восстанавливающих сахаров цветками липы сердцевидной (*Tilia cordata* Miller, 1768) в Воронежской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):147–153. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-147-153>

Accumulation of Reducing Sugars by Small-leaved Linden Flowers (*Tilia cordata* Miller, 1768) in the Voronezh Region of Russia

Nina A. Dyakova*, Alexey I. Slivkin, Sergey P. Gaponov, Elizaveta A. Bobina, Lilia A. Shishorina

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

*Corresponding author: Nina A. Dyakova. E-mail: Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Nina A. Dyakova – <https://orcid.org/0000-0002-0766-3881>; Alexey I. Slivkin – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>; Sergey P. Gaponov – <https://orcid.org/0000-0001-8430-5693>; Elizaveta A. Bobina – <https://orcid.org/0000-0002-4836-2401>; Lilia A. Shishorina – <https://orcid.org/0000-0002-1297-5126>.

Received: 11.05.2020

Revised: 19.10.2021

Published: 25.11.2021

© Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Бобина Е. А., Шишорина Л. А., 2021

© Dyakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Bobina E. A., Shishorina L. A., 2021

Abstract

Introduction. Small-leaved linden flowers are mainly used for aquatic extracts, and their pharmacological benefit is based on water-soluble polysaccharides.

Aim. The aim of this study was to investigate the rate of accumulating all reducing sugars in small-leaved linden flowers, collected in agro- and urbo-cenoses of the Voronezh region.

Materials and methods. 51 sites were selected for collecting flowers from the small-leaved linden, which is a widespread deciduous tree species in Russia. In order to determine the total level of reducing sugars in the samples, we measured glucose levels using the method described in Pharmacopoeia article "Linden Flower". Correlation coefficients were analyzed to examine in detail the effect of the major pollutants (heavy metals and arsenic) on the accumulation of reducing sugars in small-leaved linden flowers.

Results and discussion. All analyzed samples of medicinal plant raw materials were benign in terms of their reducing sugar levels. Samples collected in control (protected) areas contained reducing sugar levels 13.31 to 16.89 %, which is 6–8 times more than the lower numerical value established by the Pharmacopoeia article. In the agrocenoses of the region, the concentration of reducing sugars varied from 6.12 to 16.68 %, which is 3–8 times more than the value given in the Pharmacopoeia article. In the urbocenoses of the region, a lower level of reducing sugars was found compared to samples from protected areas (2.35–13.49 %). Correlation coefficients showed a noticeable negative impact of cadmium, chromium, cobalt, copper, zinc, as well as a moderate negative effect of lead and mercury on the accumulation of reducing sugars in the small-leaved linden flowers.

Conclusion. The lowest concentrations of reducing sugars were detected in samples harvested along the streets of large cities in the region, and along highways, roads and railways. This suggests that anthropogenic factors might negatively impact the accumulation of reducing sugars in small-leaved linden flowers in these areas. At the same time, it is possible that saccharide complexes might have reacted with heavy metals instead of the complexing agent when levels of reducing sugars in the samples were quantitatively determined. This would have the effect of underrepresenting reducing sugar levels in the raw materials.

Keywords: Voronezh region, small-leaved linden, reducing sugars, glucose, agrocenoses, urbocenoses

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

Contribution of the authors. Alexey I. Slivkin, Nina A. Dyakova, Sergey P. Gaponov invented and developed the experiment. Nina A. Dyakova, Elizaveta A. Bobina, Lilia A. Shishorina conducted pharmacognostic research and calculations. All authors participated in the discussion of the results and writing of the article.

For citation: Dyakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Bobina E. A., Shishorina L. A. Accumulation of reducing sugars by small-leaved linden flowers (*Tilia cordata* Miller, 1768) in the Voronezh region of Russia. *Razrabotka i registratsiya lekarnstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):147–153. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-147-153>

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к препаратам на основе растительного сырья возрастает с каждым годом. Это объясняется высокой терапевтической эффективностью таких лекарственных средств, а также, что наиболее важно, безвредностью и отсутствием побочных эффектов. При этом значительная доля заготовок лекарственных растений осуществляется в Центральной полосе России, отличающейся высокой плотностью населения, активной хозяйственной деятельностью, развитой сетью транспортных магистралей, большим количеством промышленных производств, интенсивными технологиями ведения сельского хозяйства [1–3]. В данных условиях нарастает угроза заготовки растительного сырья в экологически неблагоприятных районах, а потому актуальным становится выявление влияния антропогенного загрязнения на химический состав растений [4, 5].

Одним из видов, сырье от которого собирается от дикорастущих особей, является липа сердцевидная (*Tilia cordata* Mill.) – широко распространенное на территории России листопадное дерево, цветки которого издавна используются в медицине в качестве противовоспалительного, потогонного, успокаиваю-

щего, жаропонижающего, мочегонного средства [6–9]. Широкое фармацевтическое и медицинское применение обусловлено богатым химическим составом цветков липы сердцевидной, основу которого составляют полисахариды, сапонины, дубильные вещества, эфирные масла, витамины, макро- и микроэлементы [10–13].

Известно, что в стрессовых для растения условиях обитания активизируется синтез веществ антиоксидантной активности – низкомолекулярных пептидов, органических кислот, флавоноидных соединений. При этом анализ литературных данных о влиянии стрессовой антропогенной нагрузки на биосинтез в растениях веществ полисахаридной природы показал отсутствие данных [14–17].

Цель работы – изучение особенностей накопления суммы восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной, заготовленных в агро- и урбоценозах Воронежской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор территорий для заготовки цветков липы сердцевидной объясняется особенностями антропогенного воздействия (рисунок 1, таблица 1) заповед-

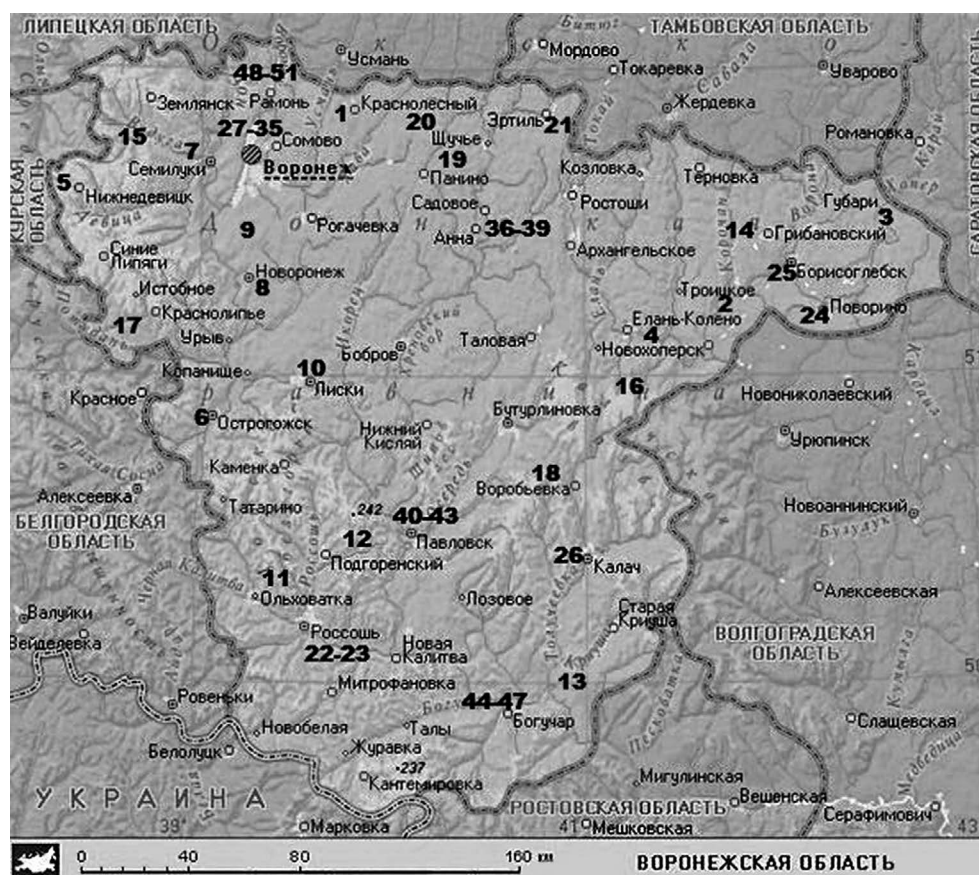


Рисунок 1. Карта заготовки цветков липы сердцевидной (расшифровка в таблице 1)

Figure 1. Core Linden Flower Blank Map (Deciphered in Table 1)

ной зоны (контроль): Воронежский биосферный заповедник (1); Хоперский заповедник (Новохоперский район); (2); Хоперский заповедник (Борисоглебский район) (3); территория разработки медно-никелевых месторождений (4); зоны, подвергшиеся радионуклидному загрязнению после аварии на Чернобыльской АЭС [Нижедевицкий (5), Острогожский (6), Семилукский (7) районы]; Нововоронежская атомная электростанция (АЭС) (8); высоковольтные линии электропередач (ВЛЭ) (9); зоны с активной сельскохозяйственной деятельностью [Лискинский (10), Ольховатский (11), Подгоренский (12), Петропавловский (13), Грибановский (14), Хохольский (15), Новохоперский (16), Репьевский (17), Воробьевский (18), Панинский (19), Эртильский (20), Верхнехавский (21), Россошанский (22) районы]; химические предприятия: АО «Минудобрения» (23), ООО «БорМаш» (24); города с развитой легкой промышленностью [Борисоглебск (25), Калач (26)]; теплоэлектроцентрали (ТЭЦ) (27); предприятие по выпуску синтетического каучука ООО «СИБУР» (28); Воронежское водохранилище (29); аэропорт (30); улица Воронежа (31); территории вдоль дорог разной степени загруженности и на удалении от них – трасса М4 «Дон» (32–35, 40–43), трасса А144 (36–39), скоростная автомобильная дорога (44–47) и железная дорога (48–51).

Изучение содержания в образцах суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу – основной группы биологически активных веществ в цветках липы сердцевидной – вели по методике ФС.2.5.0024.15 «Липы цветки» на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) [18]. Взвешивание проводили на аналитических весах A&D GH-202 (AND, Япония). Каждое определение проводили трижды, полученные результаты статистически обрабатывали при доверительной вероятности 0,95.

Все проанализированное растительное сырье соответствует требованиям фармакопейной статьи по определяемому показателю [18].

Цветки липы сердцевидной, заготовленные в контрольных районах, содержат восстанавливающие сахара в количестве от 13,31 до 16,89 %, что в 6–8 раз больше нижнего числового показателя, установленного нормативной документацией.

В лекарственном растительном сырье, собранном в агроценозах региона, концентрация восстанавливающих сахаров варьирует от 6,12 до 16,68 %, что в 3–8 раз больше приведенного в фармакопейной статье числового показателя. Эти данные для большинства образцов сопоставимы с результатами, полученными для контрольных районов заготовки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определяемые показатели содержания суммы восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной приведены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной

Table 1. Content of reducing sugars in heart-shaped linden flowers

№ п/п	Территория сбора Collection area	Содержание суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу, % Amount of reducing sugars in terms of glucose, %
1	Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	16,89 ± 0,05
2	Хоперский заповедник (Новохоперский район) Khopersky Reserve (Novokhopersky district)	13,31 ± 0,07
3	Хоперский заповедник (Борисоглебский район) Khopersky Reserve (Borisoglebsky district)	16,70 ± 0,05
4	с. Елань-Колено the village of Elan-Koleno	14,46 ± 0,05
5	Нижнедевицкий р-н Nizhnedevitsky district	13,43 ± 0,06
6	Острогожский р-н Ostrogzhsky district	8,70 ± 0,02
7	Семилукский р-н Semiluksky district	5,90 ± 0,06
8	г. Нововоронеж Novovoronezh city	9,25 ± 0,02
9	ВЛЭ (Нововоронежский городской округ) High-voltage power lines (Novovoronezhsky urban district)	8,53 ± 0,06
10	Сельскохозяйственные поля Лискинского р-на Agricultural fields of the Liskinsky district	15,56 ± 0,04
11	Сельскохозяйственные поля Ольховатского р-на Agricultural fields of the Olkhovatsky district	9,93 ± 0,04
12	Сельскохозяйственные поля Подгоренского р-на Agricultural fields of the Podgorensky district	16,68 ± 0,05
13	Сельскохозяйственные поля Петровского р-на Agricultural fields of the Peterpaul district	16,46 ± 0,02
14	Сельскохозяйственные поля Грибановского р-на Agricultural fields of the Gribanovsky district	8,17 ± 0,04

№ п/п	Территория сбора Collection area	Содержание суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу, % Amount of reducing sugars in terms of glucose, %
15	Сельскохозяйственные поля Хохольского р-на Agricultural fields of the Khokholsky district	6,12 ± 0,04
16	Сельскохозяйственные поля Новохоперского р-на Agricultural fields of the Novokhopersky district	11,18 ± 0,06
17	Сельскохозяйственные поля Репьевского р-на Agricultural fields of the Repievsky district	15,02 ± 0,04
18	Сельскохозяйственные поля Воробьевского р-на Agricultural fields of the Vorobyevsky district	14,34 ± 0,06
19	Сельскохозяйственные поля Панинского р-на Agricultural fields of the Paninsky district	15,67 ± 0,04
20	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	9,22 ± 0,04
21	Сельскохозяйственные поля Эртильского р-на Agricultural fields of the Ertily district	8,99 ± 0,05
22	Сельскохозяйственные поля Россошанского р-на Agricultural fields of the Rossoshansky district	10,18 ± 0,06
23	500 м от АО «Минудобрения» 500 m from JSC "Minudobrenia"	5,55 ± 0,07
24	500 м от ООО «БорМаш» 500 m from LLC "BorMash"	8,37 ± 0,05
25	г. Борисоглебск Borisoglebsk city	2,46 ± 0,03
26	г. Калач Kalach city	2,99 ± 0,02
27	500 м от ТЭЦ «ВоГРЭС» (г. Воронеж) 500 m from TPP "VoGRES" (Voronezh)	7,44 ± 0,04
28	500 м от ООО «СИБУР» (г. Воронеж) 500 m from LLC "SIBUR" (Voronezh)	10,14 ± 0,07
29	Побережье Воронежского водохранилища Coast of Voronezh reservoir	6,59 ± 0,03
30	Вблизи Воронежского аэропорта Near Voronezh Airport	12,38 ± 0,05
31	Улица г. Воронежа Voronezh city Street	2,90 ± 0,05
32	Автомобильная трасса М4 в Рамонском р-не (0 м) Highway M4 in Ramonsky district (0 m)	2,35 ± 0,04

№ п/п	Территория сбора Collection area	Содержание суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу, % Amount of reducing sugars in terms of glucose, %
33	Автомобильная трасса М4 в Рамонском р-не (100 м) Highway M4 in Ramonsky district (100 m)	4,94 ± 0,05
34	Автомобильная трасса М4 в Рамонском р-не (200 м) Highway M4 in Ramonsky district (200 m)	13,49 ± 0,06
35	Автомобильная трасса М4 в Рамонском р-не (300 м) Highway M4 in Ramonsky district (300 m)	12,59 ± 0,03
36	Автомобильная трасса А144 (0 м) Highway A144 (0 m)	2,46 ± 0,03
37	Автомобильная трасса А144 (100 м) Highway A144 (100 m)	3,77 ± 0,07
38	Автомобильная трасса А144 (200 м) Highway A144 200 m)	6,90 ± 0,03
39	Автомобильная трасса А144 (300 м) Highway A144 (300 m)	8,57 ± 0,07
40	Автомобильная трасса М4 в Павловском р-не (0 м) Highway M4 in Pavlovsky district (0 m)	2,83 ± 0,07
41	Автомобильная трасса М4 в Павловском р-не (100 м) Highway M4 in Pavlovsky district (100 m)	3,82 ± 0,05
42	Автомобильная трасса М4 в Павловском р-не (200 м) Highway M4 in Pavlovsky district (200 m)	6,51 ± 0,05
43	Автомобильная трасса М4 в Павловском р-не (300 м) Highway M4 in Pavlovsky district (300 m)	11,43 ± 0,06
44	Нескоростная автомобильная дорога (0 м) Non-high-speed road (0 m)	5,76 ± 0,06
45	Нескоростная автомобильная дорога (100 м) Non-high-speed road (100 m)	7,97 ± 0,05
46	Нескоростная автомобильная дорога (200 м) Non-high-speed road (200 m)	10,65 ± 0,07
47	Нескоростная автомобильная дорога (300 м) Non-high-speed road (300 m)	10,84 ± 0,01
48	Железная дорога (0 м) Railway (0 m)	3,59 ± 0,05
49	Железная дорога (100 м) Railway (100 m)	6,41 ± 0,06
50	Железная дорога (200 м) Railway (200 m)	8,68 ± 0,06
51	Железная дорога (300 м) Railway (300 m)	7,38 ± 0,05
Числовой показатель по ФС [18] Numerical indicator for pharmacopoeia article		Не менее 2 Not less than 2

Для цветков липы сердцевидной, заготовленных в урбоценозах региона, показано более низкое содержание восстанавливающих сахаров, чем для образцов заповедных зон (от 2,35 до 13,49 %). В образцах, заготовленных на улицах г. Борисоглебска, г. Калача, г. Воронежа, вдоль трасс М4 и А144, выявлено снижение содержания суммы восстанавливающих сахаров (менее 3 %). Также низкие результаты содержания восстанавливающих сахаров получены для цветков липы сердцевидной, собранных на расстоянии 100 м от автомобильных трасс, вдоль железной дороги, – для данных образцов показатель варьировал от 3 до 4 %, что позволило сделать вывод об отрицательном влиянии антропогенной нагрузки на накопление в цветках липы сердцевидной восстанавливающих сахаров. При этом сырье со сниженным содержанием восстанавливающих сахаров также отличается сравнительно высоким содержанием тяжелых металлов и мышьяка [19]. Данные элементы способны связываться с ОН-группами конденсированных сахаров. Возможно, что прочные комплексы сахаридов с тяжелыми металлами затрудняют образование комплексов с комплексообразователем, используемым в методике количественного определения восстанавливающих сахаров, что может исказить полученные результаты об уровне биологически активных веществ в сырье в сторону некоторого ложного снижения.

Для подробного изучения влияния концентрации тяжелых металлов и мышьяка на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной анализировали коэффициенты корреляции (таблица 2) [19, 20].

Рассчитанные значения коэффициентов корреляции показали заметное отрицательное влияние кадмия, хрома, кобальта, меди, цинка, а также умеренное отрицательное влияние свинца и ртути на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализирован 51 образец цветков липы сердцевидной, собранный в различных урбо- и агроценозах Воронежской области. В образцах определено содержание суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу. Все проанализированное лекарственное растительное сырье признано доброкачественным по исследуемому показателю. Образцы, собранные на контрольных (заповедных) территориях, содержат восстанавливающие сахара в количестве от 13,31 до 16,89 %, что в 6–8 раз больше нижнего числового показателя, установленного нормативной документацией. В лекарственном растительном сырье, собранном в агроценозах региона, концентрация восстанавливающих сахаров варьирует от 6,12 до 16,68 %, что в 3–8 раз больше приведенного в фармакопейной статье числового показателя. Для цветков липы сердцевидной, заготовленных в урбоценозах региона, в целом показано более низкое содержание восстанавли-

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между содержанием суперэкооксидантов и восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной

Table 2. Correlation coefficients between superoxocidants and reducing sugars in heart linden flowers

Элемент Element	Pb	Hg	Cd	As	Ni	Cr	Co	Cu	Zn
Коэффициент корреляции Correlation coefficient	-0,31	-0,31	-0,52	-0,26	-0,24	-0,67	-0,70	-0,69	-0,67

ливающих сахаров, чем для образцов заповедных зон (от 2,35 до 13,49 %). Наиболее низкие результаты получены для образцов, заготовленных на улицах крупных городов области, вдоль автомобильных трасс и железной дороги, что указывает на отрицательное влияние антропогенной нагрузки на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной. Представляется вероятным, что прочные комплексы сахаридов с тяжелыми металлами затрудняют образование комплексов с комплексообразователем, используемым в методике количественного определения восстанавливающих сахаров, что отражается на уровне определяемых биологически активных веществ в сырье, искажая полученные результаты в сторону их ложного снижения. Рассчитанные значения коэффициентов корреляции показали заметное отрицательное влияние кадмия, хрома, кобальта, меди, цинка, а также умеренное отрицательное влияние свинца и ртути на накопление восстанавливающих сахаров в цветках липы сердцевидной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Великанова Н. А. Экологическая оценка состояния лекарственного растительного сырья: на примере *Polygonum aviculare* L. и *Plantago major* L. в урбоусловиях города Воронежа и его окрестностей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Воронеж; 2013. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/ekologicheskaya-otsenka-sostoyaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syr'ya/read>. Ссылка активна на 09.07.2021.
2. Баяндин И. И., Загурская Ю. В. Взаимосвязь вторичного метаболизма и химических элементов в лекарственных растениях. *Сибирский медицинский журнал*. 2014;8:107–111.
3. Дьякова Н. А. Оценка радионуклидного загрязнения растительных ресурсов Воронежской области на примере цветков липы сердцевидной. *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. 2020;134:87–93. DOI: 10.36305/0513-1634-2020-134-87-93.
4. Кавеленова Л. М., Здетовский А. Г., Огневенко А. Я. К специфике содержания зольных веществ в листьях древесных растений в городской среде в условиях лесостепи (на примере Самары). *Химия растительного сырья*. 2001;3:85–90.
5. Бухарина И. Л., Кузьмина А. М., Кузьмин П. А. Особенности содержания танинов в листьях древесных растений в техногенной среде. *Химия растительного сырья*. 2015;4:71–76.
6. Куркин В. А. Фармакогнозия. Самара: Офорт; 2004. 1179 с.
7. Гузев К. С. Ассортименты лекарственных средств и технологических приемов, которые применяли первые врачи. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):304–309.
8. Веселова Д. В., Степанова Э. Ф. Использование в современной медицине цветков липы сердцевидной. *Фармация и фармакология*. 2016;4(1):4–9. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-4-9.
9. Темирбулатова А. М., Степанова Э. Ф., Веселова Д. В., Лежнева Л. П. Исследования по расширению спектра использования экстрактов родиолы розовой, липы сердцевидной и астрагала эспарцетного в медицинской практике. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2019;5(1):84–93. DOI: 10.18413/2313-8955-2019-5-1-0-6.
10. Алексашина С. А., Макарова Н. В. Сравнительное изучение антиоксидантной активности, фенольных соединений и флаво-

ноидов цветков липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), донника лекарственного (*Melilotus officinalis* L.), листьев смородины (*Ribes nigrum* L.). *Химия растительного сырья*. 2019;3:153–159. DOI: 10.14258/jcrpm.2019034623.

11. Попов Д. М., Зарубина Н. В. Сравнительное качественное и количественное определение углеводов в цветках и листьях липы сердцевидной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013;2(3):50–53.
12. Платонов В. В., Хадарцев А. А., Сухих Г. Т., Яркова Т. А., Волочаева М. В., Дунаева И. В. Хромато-масс-спектрометрия органического вещества липы – цветки (липа сердцевидная-мелколистная – *Tilia cordata* Mill. – семейство липовых). *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2019;3:104–124. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16409. Доступно по: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-3/3-1.pdf>. Ссылка активна на 09.07.2021.
13. Лупинская С. М., Орехова С. В., Васильева О. Г. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сыровоточных экстрактов на их основе. *Химия растительного сырья*. 2010;3:143–145.
14. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20(7):933–956. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
15. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5(3):218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
16. Loreto F., Schnitzler J.-P. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science*. 2010;15(3):154–166. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.12.006.
17. Ferdinand M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic Stress Responses in Plants*. New York: Springer Science; 2012. 159–179 p. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1.
18. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIV. Том 4. М.: Министерство здравоохранения РФ; 2018. 1883 с.
19. Дьякова Н. А. Накопление тяжелых металлов и мышьяка цветками липы сердцевидной, произрастающей в агро- и урбо-эко-системах Воронежской области. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2020;5:70–79. DOI: 10.17076/eco1150.
20. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Контроль радиационной безопасности и качества лекарственного растительного сырья Воронежской области на примере корней лопуха обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):73–77. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-73-77.

REFERENCES

1. Velikanova N. A. *Ekologicheskaya otsenka sostoyaniya lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya: na primere Polygonum aviculare L. i Plantago major L. v urbousloviyakh goroda Voronezha i ego okrestnostey* [Ecological assessment of the state of medicinal plant raw materials (using the example of *Polygonum aviculare* L. and *Plantago major* L.) in urban conditions of the city of Voronezh and its environs] [dissertation]. Voronezh; 2013. Available at: <https://www.dissercat.com/content/ekologicheskaya-otsenka-sostoyaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syr'ya/read>. Accessed: 09.07.2021. (In Russ.)
2. Bayandina I. I., Zagurskaya Y. V. The relationship of secondary metabolism and chemical elements in medicinal plants. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2014;8:107–111. (In Russ.)
3. Dyakova N. A. Assessment of radionuclide contamination of plant resources of the Voronezh region by example of leaves of winter linden tree. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo*

- sada = *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2020;134:87–93. (In Russ.) DOI: 10.36305/0513-1634-2020-134-87-93.
4. Kavelenova L. M., Zdetovetskiy A. G., Ognevenko A. Ya. *K specifi- kة soderzhaniya zol'nyh veshchestv v list'yah drevesnyh rastenij v gorodskoy srede v usloviyah lesostepi (na primere Samary)* [On the specificity of ash content in the leaves of woody plants in an urban environment under forest-steppe conditions (for example, Samara)]. *Khimija rastitel'nogo syr'ja* = *Chemistry of plant raw material*. 2001;3:85–90. (In Russ.)
5. Bukharina I. L., Kuz'mina A. M., Kuz'min P. A. Features of the content of tannins in leaves of wood plants in the technogenic environment. *Khimija rastitel'nogo syr'ja* = *Chemistry of plant raw material*. 2015;4:71–76. (In Russ.)
6. Kurkin V. A. *Farmakognosiya* [Pharmacognosy]. Samara: Ofort; 2004. 1179 p. (In Russ.)
7. Guzev K. S. Assortments of drugs and technological receives, which the first doctors applied. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2017;4(21):304–309. (In Russ.)
8. Veselova D. V., Stepanova E. F. The use of *tilia cordata* flowers in contemporary medicine. *Farmatsiya i farmakologiya* = *Pharmacy & Pharmacology*. 2016;4(1):4–9. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-4-9.
9. Temirbulatova A. M., Stepanova E. F., Veselova D. V., Lezhneva L. P. Research on the expansion of the use of extracts of *Rhodiola rosea*, *Linden cordate* and *Astragalus asper* in clinical practice. *Nauchnye rezul'taty biomeditsinskikh issledovaniy* = *Research Results in Biomedicine*. 2019;5(1):84–93. (In Russ.) DOI: 10.18413/2313-8955-2019-5-1-0-6.
10. Aleksashina S. A., Makarova N. V. Comparative study of antioxidant activity, phenolic compounds and flavonoids of linden-shaped flowers of the heart (*Tilia cordata* Mill.), medicinal sage (*Salvia officinalis* L.), medicinal sweet clover (*Melilotus officinalis* L.), currant leaves (*Ribes nigrum* L.). *Khimija rastitel'nogo syr'ja* = *Chemistry of plant raw material*. 2019;3:153–159. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019034623.
11. Popov D. M., Zarubina N. V. Comparative quantitative and qualitative analysis of carbohydrates in blossoms and leaves of *tilia cordata*. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2013;2(3):50–53. (In Russ.)
12. Platonov V. V., Khadartsev A. A., Sukhikh G. T., Yarkova T. A., Volo- chaeva M. V., Dunaeva I. V. Chromato mass spectrometry of organic matter lips – flowers (small-leaved heart-shaped linden – *Tilia cordata* Mile – family of lime trees). *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij. Elektronnoe izdanie*. = *Journal of new medical technologies. EEdition*. 2019;3:104–124. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16409. Available at: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-3/3-1.pdf>. Accessed: 09.07.2021. (In Russ.)
13. Lupinskaya S. M., Orekhova S. V., Vasil'eva O. G. *Izuchenie biologicheskii aktivnykh veshchestv lipy, krapivy i dushicy i syvorotochnykh ekstraktov na ih osnove* [Study of biologically active substances of linden, nettle and oregano and serum extracts based on them]. *Khimija rastitel'nogo syr'ja* = *Chemistry of plant raw material*. 2010;3:143–145. (In Russ.)
14. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20(7):933–956. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
15. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5(3):218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
16. Loreto F., Schnitzler J.-P. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science*. 2010;15(3):154–166. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.12.006.
17. Ferdinando M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic Stress Responses in Plants*. New York: Springer Science; 2012. 159–179 p. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1.
18. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. Edition XIV. V. 4. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya RF; 2018. 1883 p. (In Russ.)
19. Dyakova N. A. Accumulation of heavy metals and arsenic in flowers of the small leaved lime growing in agricultural and urban ecosystems of the Voronezh region. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk* = *Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences*. 2020;5:70–79. (In Russ.) DOI: 10.17076/eco1150.
20. Dyakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. Control of radioactive safety and quality of medicinal vegetable raw materials of the greater burdock (*Arctium lappa* L.) roots in Voronezh region. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2019;8(1):73–77. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-73-77.

Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии

А. В. Марухленко*, Т. В. Максимова, Т. В. Плетенева, М. А. Морозова

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

*Контактное лицо: Марухленко Алла Владимировна. E-mail: alla.marukhlenko@yandex.ru

ORCID: А. В. Марухленко – <https://orcid.org/0000-0003-0174-9489>; Т. В. Максимова – <https://orcid.org/0000-0002-0464-7798>; Т. В. Плетенева – <https://orcid.org/0000-0001-7297-980X>; М. А. Морозова – <https://orcid.org/0000-0003-1586-2183>.

Статья поступила: 21.06.2020

Статья принята в печать: 00.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Производство, процесс стандартизации и контроль качества различных БАД, содержащих в составе хелатированный цинк, требуют применения валидированных количественных методик оценки. В настоящей работе предложена методика рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФС) для определения содержания цинка в составе координационных соединений на примере синтезированного хелатного комплекса с метионином.

Цель. Синтезировать хелатный комплекс состава $Zn(Met)_2$, разработать и валидировать методику его количественного анализа с применением метода РФС.

Материалы и методы. Синтезированный хелатный комплекс цинка был исследован методом ИК-спектроскопии. Для разработки методики количественной оценки содержания цинка в синтезированном комплексе был использован метод РФС. В качестве калибровочных стандартов были использованы сухие смеси моногидрата сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16 и водные растворы смеси сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met 1:2 с концентрацией (по цинку) от 0,5 до 100 ммоль/л. В качестве арбитражного метода количественного определения содержания цинка в исследуемых образцах было использовано комплексометрическое титрование.

Результаты и обсуждение. ИК-спектр хелатного комплекса подтвердил наличие донорно-акцепторной связи между Zn^{2+} и атомом азота аминогруппы метионина. Результаты комплексометрии показали, что полученные в ходе синтеза хелатные соединения имеют состав, соответствующий стехиометрической формуле $Zn(Met)_2$. Анализ стандартных образцов сухих смесей цинка сульфата моногидрата и метионина методом РФС продемонстрировал наличие матричного эффекта и невозможность использования данной калибровочной модели для точной оценки содержания цинка в хелатном соединении. По данным спектров РФС водных растворов, содержащих цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 при концентрации цинка 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 и 100 ммоль/л, построен калибровочный график – зависимость интенсивности сигнала флуоресценции для $K\alpha$ линии цинка от концентрации цинка в растворе ($r = 0,9996$). Методика оценена по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитическая область. Специфичность валидируемой методики доказана в присутствии меди, железа и серебра.

Заключение. Разработанная методика позволяет с достаточной прецизионностью и правильностью определять методом РФС содержание Zn^{2+} в его водных растворах неорганической и органической природы в диапазоне концентраций от 3 до 100 ммоль/л без влияния матрицы.

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный анализ, хелатный комплекс, цинк метионинат, определение содержания цинка, валидационные параметры

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

Вклад авторов. М. А. Морозова, Т. В. Максимова, Т. В. Плетенева придумали и разработали эксперимент. А. В. Марухленко, М. А. Морозова синтезировали образцы и провели качественную и количественную оценку полученных в результате синтеза комплексов метионината цинка. А. В. Марухленко проводила теоретические расчеты и участвовала в обработке данных. А. В. Марухленко, М. А. Морозова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Марухленко А. В., Максимова Т. В., Плетенева Т. В., Морозова М. А. Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):154–161. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161>

Development and Validation of Method for the Quantitative Determination of Zinc in its Chelate Complexes Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectroscopy

Alla V. Marukhlenko*, Tatyana V. Maksimova, Tatyana V. Pleteneva, Mariya A. Morozova

Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Alla V. Marukhlenko. E-mail: alla.marukhlenko@yandex.ru

ORCID: Alla V. Marukhlenko – <https://orcid.org/0000-0003-0174-9489>; Tatyana V. Maksimova – <https://orcid.org/0000-0002-0464-7798>; Tatyana V. Pleteneva – <https://orcid.org/0000-0001-7297-980X>; Mariya A. Morozova – <https://orcid.org/0000-0003-1586-2183>.

Received: 21.06.2020

Revised: 00.10.2021

Published: 25.11.2021

© Марухленко А. В., Максимова Т. В., Плетенева Т. В., Морозова М. А., 2021

© Marukhlenko A. V., Maksimova T. V., Pleteneva T. V., Morozova M. A., 2021

Abstract

Introduction. The production, standardization and quality control process of various dietary supplements containing chelated zinc requires validated quantitative assessment methods. In this work, we propose an X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) technique for determining the zinc content in the composition of coordination compounds using the example of a synthesized chelate complex with methionine.

Aim. To synthesize $\text{Zn}(\text{Met})_2$ chelate complex, to develop and validate a method for its quantitative analysis using the XRF method.

Materials and methods. The synthesized zinc chelate complex was investigated by IR spectroscopy. The XRF method was used to develop a method for quantifying the zinc content in the synthesized complex. We used dry mixtures of zinc sulfate monohydrate and L-methionine (Met) in a molar ratio of Zn to Met – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 and also aqueous solutions of zinc sulfate and L-methionine in a molar ratio of Zn to Met 1:2 with Zn concentrations from 0.5 to 100 mmol/l as calibration standards. Complexometric titration was used as an arbitration method for the quantitative determination of zinc content in the samples under study.

Results and discussion. The IR spectrum of chelate complex confirmed the presence of a donor-acceptor bond between Zn^{2+} and the nitrogen atom of amino group in methionine. The titration results showed chelate compounds have a composition corresponding to the stoichiometric formula $\text{Zn}(\text{Met})_2$. XRF analysis of dry standard mixed samples demonstrated the presence of matrix effect, that makes impossible an accurate assessment of zinc content in the chelate compound. According to the XRF spectra of aqueous solutions containing zinc sulfate and methionine in a ratio of 1:2 at a zinc concentration of 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 and 100 mmol/L, a calibration graph was constructed – the dependence of the fluorescence signal intensity for the K α line of zinc on the concentration of zinc in the solution ($r = 0.9996$). The method was evaluated by the following validation parameters: specificity, linearity, correctness, precision, and analytical range. The specificity of the validated method was proven in the presence of copper, iron, and silver.

Conclusion. The developed method make it possible to determine with sufficient precision and correctness the content of Zn^{2+} in its aqueous solutions of inorganic and organic nature by the XRF method in the concentration range from 3 to 100 mmol/l without the influence of the matrix.

Keywords: X-ray fluorescence analysis, chelate complex, zinc methioninate, determination of zinc content, validation parameters

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

Contribution of the authors. Mariya A. Morozova, Tatyana V. Maksimova, Tatyana V. Pleteneva planned the experiment in detail. Alla V. Marukhlenko, Mariya A. Morozova synthesized samples and carried out a qualitative and quantitative assessment of the obtained zinc methioninate complexes. Alla V. Marukhlenko performed theoretical calculations, participated in data processing. Alla V. Marukhlenko, Mariya A. Morozova participated in article text writing. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Marukhlenko A. V., Maksimova T. V., Pleteneva T. V., Morozova M. A. Development and validation of method for the quantitative determination of zinc in its chelate complexes using energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):154–161. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161>

ВВЕДЕНИЕ

Производство, процесс стандартизации и контроль качества различных биологически активных и витаминно-минеральных добавок, содержащих в составе хелатированный цинк, требуют применения валидированных количественных методик оценки. Золотым стандартом элементного неорганического анализа, традиционно применяемого в фармации, считают метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС ИСП) и атомно-абсорбционную спектроскопию (ААС) [1–3]. Трудоемкая и дорогая пробоподготовка – неотъемлемая часть ААС и АЭС – один из факторов, ограничивающих применение этих чувствительных, селективных и точных методов [4]. В соответствии с директивой международной конференции по гармонизации [International Council for Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities Q3D (R1), 2019] энергодисперсионная рентгенофлуоресцентная спектрометрия (РФС) применима для скрининга лекарственных препаратов на наличие примесей тяжелых металлов. Этот простой и экономичный метод анализа является фармакопейным и дает возможность

получения стабильных во времени калибровок для количественного анализа металлсодержащих ЛС и БАД (ГФ XIV, ОФС. 1.2.1.1.0010.15 «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия») [5].

Нами предложена методика РФС для определения содержания цинка в составе координационных соединений на примере синтезированного хелатного комплекса с метионином, установлена аналитическая область методики, проведена оценка таких валидационных параметров, как специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В научной периодике представлено достаточно способов синтеза комплексных соединений d-элементов с аминокислотами [6, 7]. В данной работе применили методику, которая характеризуется высоким процентом выхода продукта синтеза. К суспензии метионина (2 моль) в воде прибавляли гидроксид натрия (2 моль), перемешивали в течение 10 минут до полного растворения метионина и нагревали смесь до 60 °С. К гомогенному раствору порциями добавляли моногидрат сульфата цинка (1 моль), выдерживали при перемешивании в течение 20 минут при

температуре 60 °C [6]. Далее реакционную смесь охлаждали до 10 °C, выпавшие кристаллы отфильтровывали и промывали водой до отрицательной реакции фильтрата на сульфаты (по реакции осаждения с хлоридом бария) и свободный метионин (нингидриновая проба). Осадок дополнительно промывали этиловым спиртом и высушивали до постоянной массы при 105 °C в сушильном шкафу Binder RF 53 с принудительной конвекцией (Binder GmbH, Германия) [ГФ XIV, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» (способ 1)].

Для синтеза использовали L-метионин (pure, pharma grade, AppliChem, Германия) и моногидрат сульфата цинка (99,0 %, Acros Organics, Испания), качество всех прочих реактивов и растворителей (натрия гидроксид, этанол, вода очищенная) соответствовали фармакопейным стандартам.

Структуру синтезированного комплекса подтверждали при помощи спектрального анализа в ИК-области – ИК-Фурье спектрофотометр Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Inc., США), приставка НРВО с алмазной призмой. Спектральный диапазон – 4000–750 см^{-1} . Разрешение – менее 2 см^{-1} , правильность волнового числа 0,05 см^{-1} , воспроизводимость волнового числа – 0,005 см^{-1} .

Для разработки методики количественной оценки содержания цинка в синтезированном комплексе метионината цинка использовали энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония): диапазон измеряемых элементов – 11Na – 92U; рентгеновский генератор – трубка с Rh-анодом, воздушное охлаждение; напряжение 4–50 кВ, ток 1–1000 мкА; кремниевый дрейфовый детектор с термоэлектрическим охлаждением, метод подсчета – цифровой счетный фильтр; размер камеры 300 × 275 × 100 мм. Спектр рентгеновской флуоресценции при каждом измерении записывали при одинаковых настройках прибора: майларовая пленка, ширина коллиматора – 10 мм, время экспозиции – 100 с, атмосфера – воздух; количество повторных измерений для одного образца $n = 3$.

В качестве калибровочных стандартов использовали сухие, измельченные до однородного состояния смеси моногидрата сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16. Также набор калибровочных стандартов включал водные растворы смеси сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met 1:2 с концентрацией (по цинку) от 0,5 до 100 ммоль/л. При подготовке сухих калибровочных смесей и водных растворов использовали поверенное лабораторное оборудование – весы аналитические лабораторные Radwag AS 220.X2 (RADWAG, Польша), pH-метр базовый лабораторный PB-11 (Sartorius, Германия).

Арбитражный метод количественного определения содержания цинка в калибровочных стандартах и синтезированном комплексе – комплексонометрическое титрование, выполненное в соответствии с методикой государственной фармакопеи (ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0015.15 «Комплексонометрическое тит-

рование»; ГФ XIV, ФС.2.2.0036.18 «Цинка сульфат гептагидрат»).

При оценке специфичности методики анализа в качестве примесных компонентов использовали соли меди, железа и серебра: сульфат меди безводный (Merck, Германия), железа сульфат моногидрат (Sigma-Aldrich, Германия) и нитрат серебра (х.ч., ГОСТ 1277-75).

Для обработки результатов анализа и построения калибровочных моделей использовали ПО Microsoft Office Excel, OriginPro 2017 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественная и количественная оценка полученных в результате синтеза комплексов метионината цинка

По описанной методике был дважды синтезирован метионинат цинка, представляющий собой белое кристаллическое соединение, нерастворимое в воде и этиловом спирте (далее по тексту – $\text{Zn}(\text{Met})_2$ complex 1, $\text{Zn}(\text{Met})_2$ complex 2). Выход продуктов синтеза в среднем составил 70,3 %.

Согласно литературным данным, для комплексов двухвалентных катионов металлов с метионином характерен O, N тип связывания без участия в комплексообразовании метилсульфидной группы [8]. Сравнение полученных ИК-спектров НРВО метионина и $\text{Zn}(\text{Met})_2$ подтверждает предложенное строение (рисунок 1). На ИК-спектре комплекса наблюдаются две полосы координированной аминогруппы (3339, 3252 см^{-1}) с расщеплением между ними $\Delta\nu \approx 87 \text{ см}^{-1}$, последнее согласуется с представлениями о донорно-акцепторной связи между металлом и атомом азота аминогруппы [9]. На спектре метионината цинка сохраняется полоса колебаний группы CH_3S – при

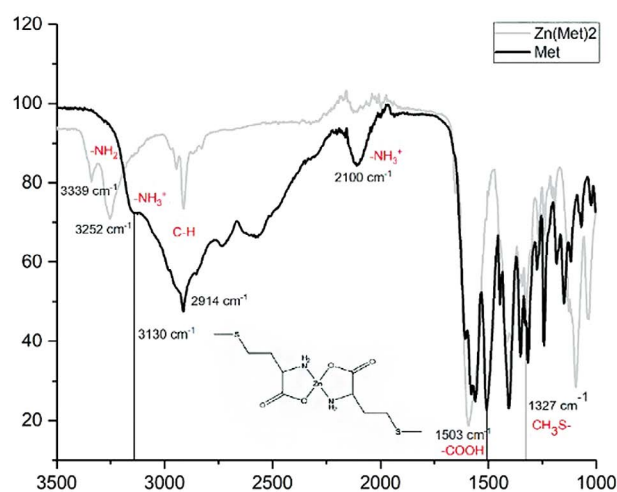


Рисунок 1. ИК-спектры НРВО L-метионина и синтезированного комплекса метионината цинка

Figure 1. ATR-IR spectra of L-methionine and synthesized zinc methioninate complex

1327 см⁻¹, т. е. атом серы не участвует в координации цинка. Отсутствие значимых полос поглощения в области частот выше 3450 см⁻¹ свидетельствует об отсутствии связи О–Н, а, следовательно, и об отсутствии молекул как кристаллизационной, так и адсорбированной воды.

Количественный анализ синтезированных комплексов методом трилонометрии после растворения их в аммиачном буферном растворе (рН 11) показал, что содержание цинка составляет 18,23 % по массе в первом комплексе, 17,97 % – во втором. Результаты количественного анализа подтверждают факт, что полученные в ходе синтеза хелатные соединения цинка с метионином имеют состав, соответствующий стехиометрической формуле $Zn(Met)_2$.

Построение калибровочной модели для оценки содержания цинка методом РФА в его хелатных комплексах без разрушения матрицы (без пробоподготовки)

Государственная фармакопея регламентирует применение РФС в количественном анализе ЛС при условии предварительного установления для матрицы данного состава точной зависимости между интенсивностью линии флуоресценции и концентрацией элемента в стандартном образце (ГФ XIV, ОФС.1.2.1.1.0010.15 «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия»). В соответствии с этими указаниями, калибровочные смеси субстанций моногидрата сульфата цинка и метионина в различных мольных соотношениях были проанализированы методом РФА. Измеряли интенсивность сигнала флуоресценции при 0,1435 нм, что на спектре соответствует Ка линии цинка (8,632 кэВ). В этих же порошках арбитражным методом трилонометрии определили точное содержание металла (%). Проведенные измерения позволили построить калибровочную модель, отражающую линейный характер зависимости между сигналом флуоресценции и количеством цинка в испытуемых образцах ($R = 0,9904$). С применением модели определили содержание цинка в синтезированных комплексах метионината цинка – $Zn(Met)_2$ complex 1, $Zn(Met)_2$ complex 2. Однако полученный результат оказался завышенным, найденные по графику значения содержания цинка в комплексах отличались от действительных в среднем на 37 %.

Очевидно, что координация атома цинка двумя молекулами метионина за счет образования связей $Zn-O$ и $Zn-N$ приводит к значительным, непропорциональным содержанию металла, изменениям сигнала рентгеновской флуоресценции (рисунок 2). Наблюдаемый матричный эффект не позволяет без дополнительной коррекции использовать для точной оценки содержания цинка в хелатном соединении калибровочную модель, построенную с использованием стандартных образцов смеси цинка сульфата моногидрата и метионина [10]. Основные концепции математической коррекции матричных эф-

фектов в рентгенофлуоресцентном анализе широко описаны в научной литературе, однако отличаются сложностью [11]. С другой стороны, влияние матричного эффекта может быть нивелировано при помощи соответствующей пробоподготовки. В соответствии с указаниями государственной фармакопеи, для уменьшения эффектов поглощения и возбуждения, искривляющих калибровочные графики, анализируемую пробу разбавляют прозрачным для рентгеновских лучей веществом, в том числе водой.

Построение калибровочной модели для определения методом РФС содержания цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Подготовленные водные растворы, содержащие цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 при концентрации цинка 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 и 100 ммоль/л, были исследованы методом РФС. По данным спектров рентгеновской флуоресценции и полученным результатам комплексонометрии этих же растворов вновь построили калибровочный график – зависимость интенсивности сигнала флуоресценции для Ка линии цинка от концентрации цинка в растворе, коэффициент корреляции 0,9996 (рисунок 3).

Полученная калибровочная модель легла в основу спектральной методики количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов, в частности метионината цинка, и была оценена по следующим валидационным параметрам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность (ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»).

1. **Специфичность.** Оценку специфичности определяли по разрешению сигнала характерной рентгеновской флуоресценции цинка от сигналов других элементов – железа, серебра и меди, а также по стабильности уровня сигнала цинка. (ГФ XIV, ОФС.1.2.1.1.0010.15 «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия»). К исходному раствору, содержащему цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 с концентрацией цинка 25 ммоль/л, добавили модельную примесную смесь – раствор, содержащий сульфат меди, нитрат серебра и сульфат железа(III), концентрация каждого из металлов 25 ммоль/л. После чего записали спектр рентгеновской флуоресценции исходного раствора и раствора с добавленными примесями. Линии характеристической флуоресценции добавленных элементов (Ag – 22,105 кэВ, Fe – 6,400 кэВ, Cu – 8,042 кэВ) не перекрывают линии цинка, интенсивность сигнала флуоресценции цинка сохраняется на том же уровне, как и в отсутствии примесных элементов (рисунок 4).
2. **Аналитическая область и линейность.** Согласно ГФ, аналитическая область методики должна быть применима в интервале от 80 до 120 % от

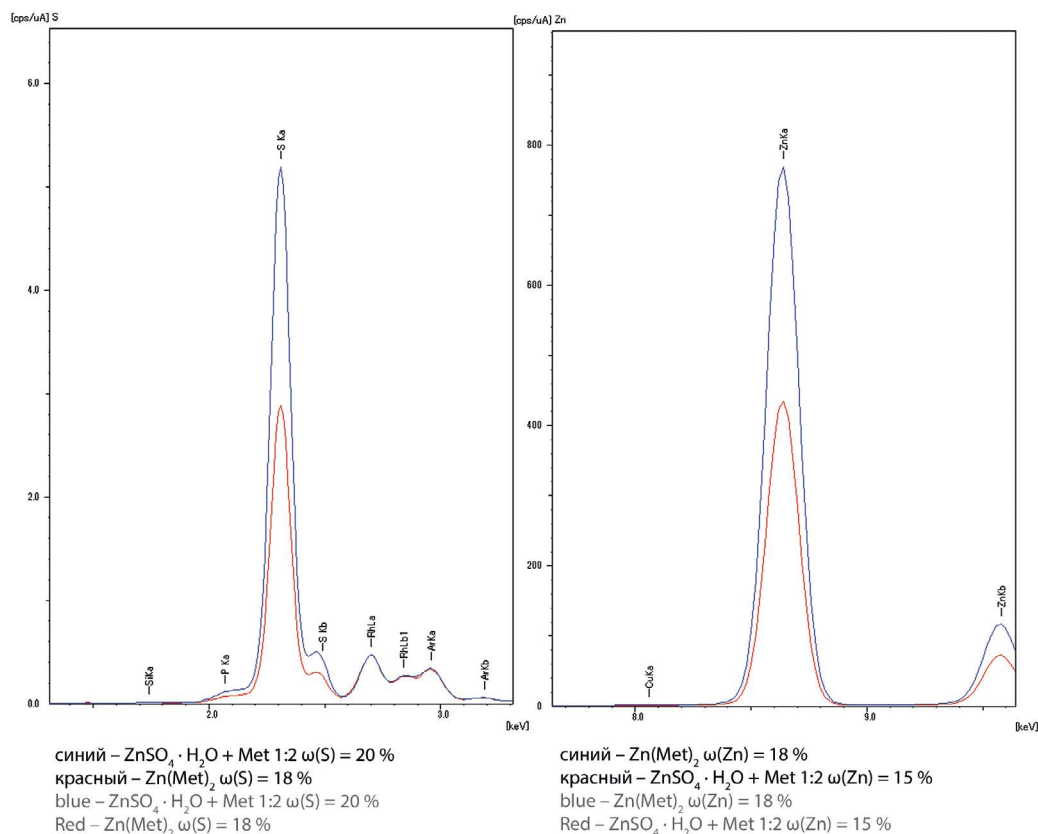


Рисунок 2. Иллюстрация матричного эффекта – усиление флуоресценции при координации атома цинка в составе хелатной структуры – спектр рентгеновской флуоресценции образца метионината цинка и смеси цинка сульфата моногидрата с метионином в молярном соотношении 1:2; слева – линия Ka серы – 2,308 кэВ; справа – линия Ka цинка – 8,632 кэВ

Figure 2. Illustration of the matrix effect – enhancement of fluorescence upon coordination of the zinc atom in the chelate structure – X-ray fluorescence spectrum of a sample of zinc methioninate and a mixture of zinc sulfate monohydrate with methionine in a molar ratio of 1:2; on the left – sulfur Ka line – 2,308 keV; on the right – zinc Ka line – 8,632 keV

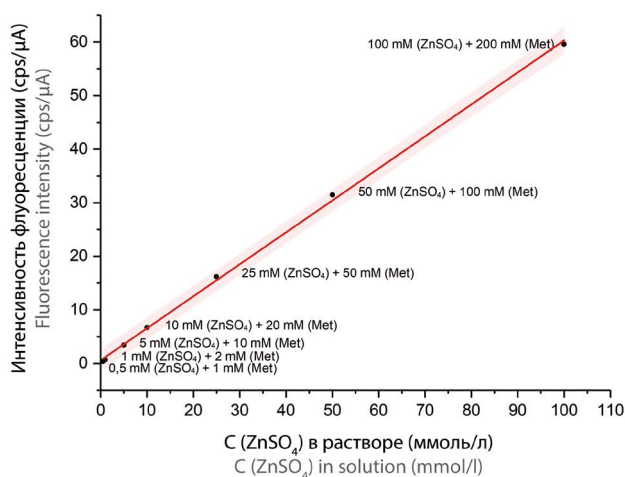


Рисунок 3. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции (Zn Ka) от концентрации цинка в водных растворах, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, концентрация цинка от 0,5 до 100 ммоль/л (розовая область – 95 % прогнозируемый интервал линейной зависимости)

Figure 3. Dependence of the intensity of the fluorescence signal (Zn Ka) on the concentration of zinc in aqueous solutions containing zinc sulfate and methionine in a ratio of 1:2, the concentration of zinc from 0,5 to 100 mmol/l (pink area – 95 % prediction interval of linear dependence)

номинального значения определяемой аналитической характеристики (ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»). Однако представленная ранее калибровочная модель (см. рисунок 3) охватывает очень широкий концентрационный диапазон (0,5–100 ммоль/л Zn), не соответствующий установленным требованиям. В указанном интервале концентраций были выделены 3 фрагмента (1–5; 5–25 и 25–100 ммоль/л Zn), каждый из которых рассматривали как отдельную калибровочную модель со своими валидационными параметрами линейности, правильности и прецизионности.

Аналитическую область оценивали для каждого из трех диапазонов концентраций по результатам измерений ($n = 3$) крайних значений и дальнейшему сравнению соответственно рассчитанных дисперсий. Для всех трех калибровочных моделей рассчитанное значение критерия Фишера оказалось меньше табличного ($F_{\text{табл.}} = 99$), что позволило сделать вывод об однородности дисперсий результатов измерений при низкой и высокой концентрации каждого из диапазонов и, следовательно, подтвердить выполнение параметра «аналитическая область» (таблица 1).

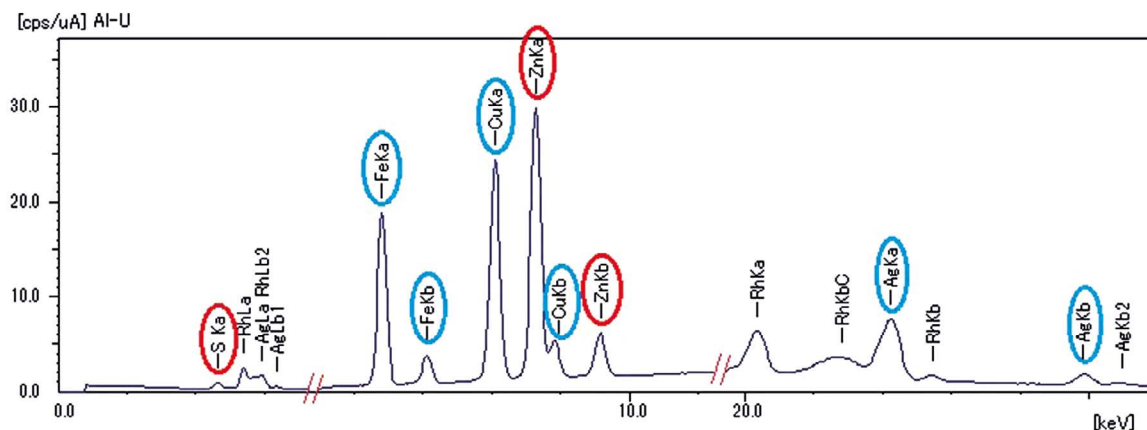


Рисунок 4. Спектр рентгеновской флуоресценции водного раствора, содержащего 25 ммоль/л сульфата цинка и 50 ммоль/л метионина, с добавлением примесей – 25 ммоль/л AgNO_3 , 25 ммоль/л CuSO_4 и 25 ммоль/л $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Figure 4. X-ray fluorescence spectrum of an aqueous solution containing 25 mmol/l zinc sulfate and 50 mmol/l methionine, with the addition of impurities – 25 mmol/l AgNO_3 , 25 mmol/l CuSO_4 and 25 mmol/l $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Для построенных калибровочных моделей было рассчитано уравнение линейной зависимости вида $y = b \cdot x + a$ и определен коэффициент корреляции (R). Характеристика «линейность» выполняется для всех трех аналитических областей предложенной методики (см. таблица 1).

Таблица 1. Результаты оценки параметров «аналитическая область» и «линейность» для методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Table 1. Results of evaluating the parameters "analytical area" and "linearity" for the XRF method for the quantitative determination of zinc in aqueous solutions of its chelate complexes

Калибровочная модель Calibration model	Аналитическая область, ммоль/л Zn Analytical area, mmol/l Zn	$F_{\text{расч.}}$ ($P = 0,99; f_1 \text{ и } f_2 = 2$) F_{value} ($P = 0,99; f_1 \text{ и } f_2 = 2$)	R	b	a*
1	1–5	40,95	0,9999	0,6992	–0,069
2	5–25	9,08	1	0,6781	–0,187
3	25–100	47,69	0,9999	0,6038	1,121

Примечание. * Тест с использованием критерия Стьюдента показал статистическую незначимость свободного члена регрессионного уравнения ($P = 0,95$ и $f = 8$), таким образом в трех концентрационных диапазонах методика дает результаты, свободные от систематической ошибки.

3. **Правильность** методики оценивали, применяя арбитражный метод комплексометрического титрования. Исследовали водные растворы, содержащие сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2 на нескольких уровнях концентраций – нижний (1 и 3 ммоль/л), средний (5 и 25 ммоль/л) и верхний (100 ммоль/л). В трех повторах были

записаны спектры рентгеновской флуоресценции, а затем проведено титрование. Результаты представлены в таблице 2. Ошибка определения превысила критическое значение в 3 % на самом нижнем аналитическом уровне – при концентрации цинка 1 ммоль/л.

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Table 2. Results of evaluating the correctness of the XRF method for the quantitative determination of zinc in aqueous solutions of its chelate complexes

Содержание цинка, ммоль/л Zinc content, mmol/l	C(ZnSO_4), ммоль/л C(ZnSO_4), mmol/l		Отклонение от действительного значения, % Measurement error, %
	Трилонометрия Chelatometry	РФА XRF	
1	1,06	0,98	6,90
	1,04	1,01	3,25
	1,08	1,01	6,25
3	3,00	2,97	1,07
	3,02	3,00	0,62
	3,02	2,99	0,94
5	5,12	5,08	0,77
	5,04	5,08	0,82
	5,04	5,02	0,39
25	25,30	25,06	0,96
	25,00	24,89	0,44
	25,60	25,10	1,96
100	102,70	101,83	0,84
	103,30	102,55	0,73
	102,30	100,34	1,92
Среднее значение отклонения от действительного значения, % Mean measurement error, %			1,86

4. **Прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность)** методики РФА оценивали по результатам трех определений водных растворов, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, для каждого из трех уровней определяемых концентраций (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах данной аналитической области.

Сходимость (повторяемость) результатов оценивали по данным, полученным в одинаковых условиях в пределах короткого промежутка времени: один и тот же исполнитель, одна и та же кювета, один и тот же исследуемый раствор. Сходимость результатов аналитической методики представлена на рисунке 5. Относительное стандартное отклонение (RSD) результатов измерений для всех концентраций растворов составило не более 2 %. На графике продемонстрировано, что с увеличением концентрации раствора величина RSD снижается и достигает предельного постоянного значения. Первая точка на графике соответствует концентрации цинка в растворе 0,1 ммоль/л, значение RSD для нее превышает критическое значение в 2 % и составляет 2,48 %.

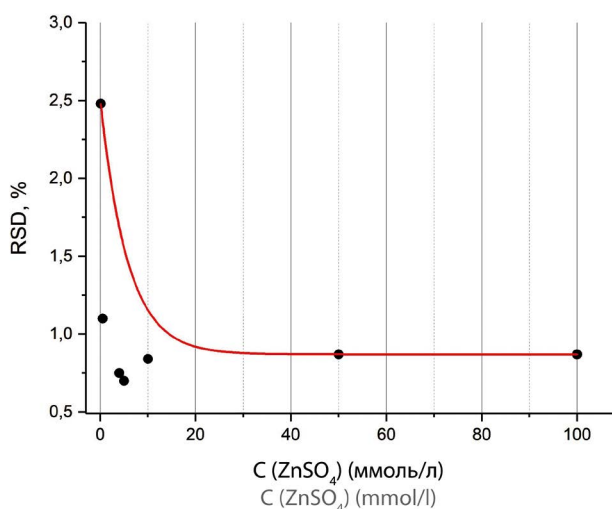


Рисунок 5. Зависимость величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) от концентрации Zn в растворе (оценка сходимости)

Figure 5. Dependence of the value of the relative standard deviation (RSD, %) on the concentration of Zn in solution (convergence assessment)

Промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность оценивали по результатам, полученным в разные дни, разными исполнителями при использовании разных кювет. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблице 3.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что валидационные характеристики разработанной методики РФА для количественного

определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов выполняются и соответствуют нормативным требованиям. Методика дает правильные воспроизводимые результаты в концентрационном диапазоне содержания цинка от 3 до 100 ммоль/л.

Таблица 3. Результаты внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Table 3. Results of the intralaboratory (intermediate) precision of the XRF method for the quantitative determination of zinc in aqueous solutions of its chelate complexes

C(ZnSO ₄), ммоль/л C(ZnSO ₄), mmol/l	Относительное стандартное отклонение (RSD), % Relative standard deviation (RSD), %
0,5	3,26
1	1,51
5	1,46
10	1,76
25	0,54
50	1,74
100	1,34

Функциональность созданной РФА методики количественного определения цинка проверили на примере водного раствора синтезированного метионата цинка (Zn(Met)₂ complex 2) с известной концентрацией металла – 50 ммоль/л. Для растворения комплекса использовали аммиачный буферный раствор (pH = 11). Далее записали спектр рентгеновской флуоресценции полученного раствора. По значению интенсивности флуоресценции для линии цинка с использованием калибровочной модели в диапазоне концентраций от 25 до 100 ммоль/л установили концентрацию металла в растворе (рисунок 6).

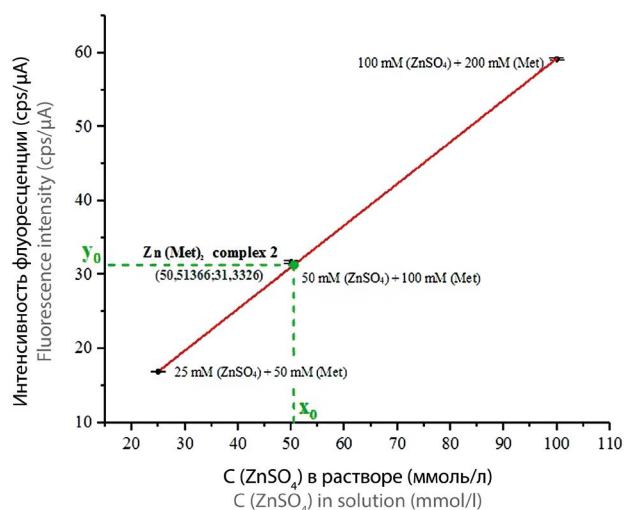


Рисунок 6. Определение концентрации цинка в растворе Zn(Met)₂ complex 2 по калибровочной модели в диапазоне концентраций от 25 до 100 ммоль/л Zn

Figure 6. Determination of zinc concentration in solution of Zn(Met)₂ complex 2 using a calibration model in the concentration range from 25 to 100 mmol/l of Zn

Концентрация цинка в водном растворе $Zn(Met)_2$ complex 2, определенная по калибровочной модели, составила 50,51 ммоль/л, ошибка определения – 1,02 %. Полученные результаты подтверждают отсутствие матричного эффекта и, следовательно, функциональность разработанной методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика позволяет с достаточной правильностью и прецизионностью определять методом РФС содержание Zn^{2+} в его водных растворах неорганической и органической природы в диапазоне концентраций от 3 до 100 ммоль/л.

ЛИТЕРАТУРА

- Li G., Schoneker D., Ulman K. L., Sturm J. J., Thackery L. M., Kaufman J. F. Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(12):4197–4206. DOI: 10.1002/jps.24650.
- Neubauer K., Hineman A. Meeting the USP and Guidelines with ICP-OES. *Spectroscopy*. 2018;33(9):8–15.
- Hineman A. Determination of Elemental Impurities in Antacids by ICP-MS According to the Validation Protocols Defined in USP Chapters and and ICH Q3D Step 4 Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(7):36–40.
- Klopper R. Microwave Digestion for Elemental Impurities Analysis According to ICH and USP Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(1):44–49.
- Furukawa H., Davis D. Using XRF as an Alternative Technique to Plasma Spectrochemistry for the New USP and ICH Directives on Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials. *Spectroscopy*. 2017;32(7):12–17.
- Кадырова Р. Г., Кабиров Г. Ф., Муллахметов Р. Р. Синтез медных и цинковых солей метионина и глицина. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. 2013;1(213):109–115.
- Кадырова Р. Г., Кабиров Г. Ф., Муллахметов Р. Р. Синтез и свойства комплексных солей биогенных кислот макро- и микроэлементов. Казань: Казан. гос. энерг. ун-т; 2016. 115 с.
- Головнев Н. Н., Новикова Г. В., Васильев А. Д., Исакова Т. В., Ронжина Е. А. Синтез соединений d-элементов с аминокислотами. *Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки*. 2006;2:38–44.
- Mamun M. A., Ahmed O., Bakshi P. K., Ehsan M. Q. Synthesis and spectroscopic, magnetic and cyclic voltammetric characterization of some metal complexes of methionine: $[(C_5H_{10}NO_2S)_2MII]$; $MII=Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II)$ and $Hg(II)$. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2010;14(1):23–31. DOI: 10.1016/j.jscs.2009.12.005.
- Rousseau R. M. Concept of the influence coefficient. *The Rigaku Journal*. 2001;18(1):8–21.
- Rousseau R. M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2006;61(7):759–777. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.014.
- Klopper R. Microwave Digestion for Elemental Impurities Analysis According to ICH and USP Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(1):44–49.
- Furukawa H., Davis D. Using XRF as an Alternative Technique to Plasma Spectrochemistry for the New USP and ICH Directives on Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials. *Spectroscopy*. 2017;32(7):12–17.
- Kadyrova R. G., Kabirov G. F., Mullakhmetov R. R. *Sintez mednykh i tsinkovykh soley metionina i glitsina* [Synthesis of copper and zinc salts of methionine and glycine]. *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Bauman*. 2013;1(213):109–115. (In Russ.)
- Kadyrova R. G., Kabirov G. F., Mullakhmetov R. R. *Sintez i svoystva kompleksnykh soley biogennykh kislot makro- i mikroelementov* [Synthesis and properties of complex salts of biogenic acids of macro- and microelements]. Kazan: Kazanskiy gosudarstvennyy energeticheskiy universitet; 2016. 115 p. (In Russ.)
- Golovnev N. N., Novikova G. V., Vasil'ev A. D., Isakova T. V., Ronzhina E. A. *Sintez soedineniy d-elementov s aminokislotami* [Synthesis of d-element compounds with amino acids]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*. 2006;2:38–44. (In Russ.)
- Mamun M. A., Ahmed O., Bakshi P. K., Ehsan M. Q. Synthesis and spectroscopic, magnetic and cyclic voltammetric characterization of some metal complexes of methionine: $[(C_5H_{10}NO_2S)_2MII]$; $MII=Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II)$ and $Hg(II)$. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2010;14(1):23–31. DOI: 10.1016/j.jscs.2009.12.005.
- Rousseau R. M. Concept of the influence coefficient. *The Rigaku Journal*. 2001;18(1):8–21.
- Rousseau R. M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2006;61(7):759–777. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.014.

REFERENCES

- Li G., Schoneker D., Ulman K. L., Sturm J. J., Thackery L. M., Kaufman J. F. Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(12):4197–4206. DOI: 10.1002/jps.24650.
- Neubauer K., Hineman A. Meeting the USP and Guidelines with ICP-OES. *Spectroscopy*. 2018;33(9):8–15.
- Hineman A. Determination of Elemental Impurities in Antacids by ICP-MS According to the Validation Protocols Defined in USP Chapters and and ICH Q3D Step 4 Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(7):36–40.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-162-168>
УДК 619:576.807.9



Оригинальная статья / Research article

Модулирование противогрибковой активности антимикотических препаратов с помощью фарнезола

Н. П. Сачивкина*, А. Н. Сенягин, И. В. Подопрigора, Д. Г. Браун, В. В. Виссарионова

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

*Контактное лицо: Сачивкина Надежда Павловна. E-mail: sachivkina@yandex.ru

ORCID: Н. П. Сачивкина – <https://orcid.org/0000-0003-1100-929X>; А. Н. Сенягин – <https://orcid.org/0000-0002-4981-0149>; И. В. Подопрigора – <https://orcid.org/0000-0003-4099-2967>; Д. Г. Браун – <https://orcid.org/0000-0002-1933-9114>; В. В. Виссарионова – <https://orcid.org/0000-0002-8751-7533>.

Статья поступила: 20.05.2021

Статья принята в печать: 18.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Клинические штаммы микроорганизмов, в том числе и условно-патогенные дрожжеподобные грибы (ДПГ) рода *Candida*, обладают устойчивостью к используемым в настоящее время противогрибковым препаратам. В связи с этим поиск альтернативных путей потенцирования активности антимикробных средств по отношению к инфекционному агенту является важным и актуальным направлением исследований. Изучение сочетаний существующих антимикотических препаратов и лекарственного экстракта растительного происхождения – фарнезола – одно из перспективных подходов в борьбе с резистентными штаммами ДПГ рода *Candida*. В наших предыдущих исследованиях было показано, что фарнезол проявляет относительную активность против биопленок ДПГ *Candida albicans*. В данной работе мы использовали 6 клинических изолятов и один музейный штамм ДПГ *C. albicans* для исследования влияния фарнезола на противогрибковую активность антимикотических препаратов.

Цель. Оценить модулирующее действие фарнезола на противогрибковую активность некоторых антимикотических препаратов.

Материалы и методы. Для определения чувствительности 7 штаммов ДПГ *C. albicans* к антимикотическим препаратам «Нистатин» (NYS 50 µg), «Кетоконазол» (KET 10 µg), «Клотримазол» (CTR 10 µg), «Амфотерицин В» (AMB 10 µg), «Вориконазол» (VRC 10 µg) использовали диско-диффузионный метод. На диск с антимикотическим препаратом наносили раствор фарнезола в концентрациях 100, 50 и 25 мкМ в объеме 25 мкл. В качестве контроля использовали стерильный физиологический раствор (ФР) (рН 7,0; V = 25 мкл).

Результаты и обсуждение. В 34,3 % случаев от общего числа экспериментов можно говорить о модулирующем действии растворов фарнезола на противогрибковую активность антимикотических препаратов при комбинации фарнезол + антимикотический препарат. Во всех этих случаях чувствительность ДПГ *C. albicans* к антимикотическому препарату увеличивается.

Заключение. Результаты данного исследования содержат полезную информацию для понимания механизма действия QS-молекул, обладающих противогрибковой активностью, а также они являются обоснованием для практического применения некоторых QS-молекул в терапии инфекционных заболеваний, вызванных ДПГ рода *Candida*. Проведенное исследование демонстрирует, что фарнезол может быть рекомендован в качестве активного вещества, улучшающего чувствительность ДПГ рода *Candida* к антимикотическим препаратам, особенно в случае с полирезистентными штаммами ДПГ рода *Candida*.

Ключевые слова: фарнезол, *Candida albicans*, антимикотики, «Нистатин», «Кетоконазол», «Клотримазол», «Амфотерицин В», «Вориконазол»

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

Вклад авторов. Н. П. Сачивкина, А. Н. Сенягин и И. В. Подопрigора разработали и провели исследование. Д. Г. Браун и В. В. Виссарионова участвовали в обработке полученных результатов. Все авторы участвовали в написании статьи, а также в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование финансировалось Программой стратегического академического лидерства РУДН и исследовательским проектом № 031622-0-000 кафедры микробиологии и вирусологии Медицинского института РУДН под руководством И. В. Подопрigора.

Для цитирования: Сачивкина Н. П., Сенягин А. Н., Подопрigора И. В., Браун Д. Г., Виссарионова В. В. Модулирование противогрибковой активности антимикотических препаратов с помощью фарнезола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):162–168. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-162-168>

Modulating the Antifungal Activity of Antimycotic Drugs with Farnesol

Nadezhda P. Sachivkina*, Alexander N. Senyagin, Irina V. Podoprigora, Dana G. Brown, Vera V. Vissarionova

Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Nadezhda P. Sachivkina. E-mail: sachivkina@yandex.ru

ORCID: Nadezhda P. Sachivkina – <https://orcid.org/0000-0003-1100-929X>; Alexander N. Senyagin – <https://orcid.org/0000-0002-4981-0149>;

Irina V. Podoprigora – <https://orcid.org/0000-0003-4099-2967>; Dana G. Brown – <https://orcid.org/0000-0002-1933-9114>; Vera V. Vissarionova – <https://orcid.org/0000-0002-8751-7533>.

Received: 20.05.2021

Revised: 18.10.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Clinical strains of microorganisms, including opportunistic yeast-like fungi (YLF) of the genus *Candida*, are resistant to currently used antifungal drugs. In this regard, the search for alternative ways to potentiate the activity of antimicrobial agents in relation to the infectious agent is an important and relevant area of research. The study of combinations of existing antimycotic drugs and a medicinal extract of plant origin – farnesol – is one of the promising approaches in the fight against resistant strains of YLF genus *Candida*. In our previous studies, farnesol has been shown to exhibit relative activity against YLF *Candida albicans* biofilms. In this study, we used 6 clinical isolates and one museum strain YLF *C. albicans* to study the effect of farnesol on the antifungal activity of antimycotic drugs.

© Сачивкина Н. П., Сенягин А. Н., Подопрigора И. В., Браун Д. Г., Виссарионова В. В., 2021

© Sachivkina N. P., Senyagin A. N., Podoprigora I. V., Brown D. G., Vissarionova V. V., 2021

Aim. To prove that farnesol can increase the antifungal activity of certain antimycotics.

Materials and methods. To determine the sensitivity of 7 strains of YLF *C. albicans* to the antimycotic drugs "Nystatin" (NYS 50 µg), "Ketoconazole" (KET 10 µg), "Clotrimazole" (CTR 10 µg), "Amphotericin B" (AMB 10 µg), "Voriconazole" (VRC 10 µg) disk diffusion test was used. A solution of farnesol in concentrations of 100, 50 and 25 µM in a volume of 25 µl was applied to the disk with the antimycotic drug. Sterile physiological (PhS) solution was used as a control (pH 7.0; V = 25 µl).

Results and discussion. In 34.3 % of experiments we can talk about the modulating effect of farnesol solutions on the antifungal activity of antimycotic drugs. In all these cases, the sensitivity of YLF *C. albicans* to the antimycotic drug increases.

Conclusion. The results of this study provide useful information for understanding the mechanism of QS-molecules action with antifungal activity, as well as they are the basis for the practical application of some QS-molecules in the treatment of infectious diseases caused by YLF of the genus *Candida*. The study demonstrates that farnesol can be recommended as an active substance that improves the sensitivity of YLF *Candida* to antimycotic drugs, especially in the case of multi-resistant strains *Candida*.

Keywords: farnesol, *Candida albicans*, antimycotics, "Nystatin", "Ketoconazole", "Clotrimazole", "Amphotericin B", "Voriconazole"

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

Contribution of the authors. Nadezhda P. Sachivkina, Alexander N. Senyagin and Irina V. Podoprighora developed and conducted the study. Dan G. Brown and Vera V. Vissarionova participated in the processing of the obtained results. All the authors participated in the writing of the article, as well as in the discussion of the results.

Funding. This research was funded by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program and Research Project No. 031622-0-000 of the Department of Microbiology and Virology RUDN Medical Institute under direction I. V. Podoprighora.

For citation: Sachivkina N. P., Senyagin A. N., Podoprighora I. V., Brown D. G., Vissarionova V. V. Modulating the antifungal activity of antimycotic drugs with farnesol. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):162–168. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-162-168>

ВВЕДЕНИЕ

Candida albicans – это условно-патогенные дрожжеподобные грибы, которые могут угрожать здоровью человека с ослабленным иммунитетом. Увеличение в популяции ДПГ рода *Candida* числа резидентных штаммов требует от научного мира либо поиска новых противогрибковых препаратов, либо использование альтернативных подходов в направлении восстановления чувствительности микроорганизмов к уже существующим антимикотическим препаратам. В наших предыдущих исследованиях было показано, что фарнезол оказывает относительно сильное действие на способность ДПГ *C. albicans* формировать биопленки, и основной механизм в этом случае, вероятно, связан с подавлением развития гифальных форм ДПГ *C. albicans* [1, 2].

Известно, что в биологических сообществах микроорганизмы используют для своей коммуникации различные механизмы. В зависимости от плотности клеток бактерии и ДПГ рода *Candida* могут продуцировать сигнальные молекулы QS (например, вторичные метаболиты), которые участвуют в регуляции экспрессии генов и координации коллективного поведения в своей естественной нише. Существование этих вторичных метаболитов играет главную роль в адгезии, колонизации тканей и поверхностей клеток хозяина, морфогенезе и развитии биопленки. У дрожжей и ДПГ фарнезол играет главную роль в морфологическом переходе, ингибируя продукцию гифов в зависимости от концентрации, в то время как тирозол выполняет противоположную функцию, стимулируя переход от сферических клеток к форме заводышевой трубки.

Согласно данным литературы, фарнезол непрерывно продуцируется в биопленках ДПГ рода *Candida* при росте в диапазоне температур от 23 до 43 °C и в количествах, примерно пропорциональных колониеобразующим единицам на мл (КОЕ/мл). Химически фарнезол представляет собой ациклический сесквитерпеновый спирт, эндогенно синтезируемый по эргостериновому пути. Его синтез не зависит ни от типа источника углерода и азота, ни от химической природы питательной среды. Фарнезол является термостабильной молекулой, которая не подвергается воздействию экстремальных значений pH.

Фарнезол в качестве QS-молекулы участвует в регуляции различных физиологических процессов у ДПГ рода *Candida*, включая филаментацию, образование биопленок, восприимчивость к лекарственным средствам и апоптоз [3]. Это соединение продуцируется многими микроорганизмами, главным образом ДПГ, а также содержится во многих эфирных маслах растений [4, 5]. Секреция фарнезола была подтверждена при различных условиях у восьми представителей ДПГ рода *Candida*: *albicans*, *dubliniensis*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *guilliermondii*, *kefyr*, *krusei* и *glabrata*. Однако больше всего работ российских и зарубежных ученых посвящено его действию на биопленки условно-патогенного вида – *C. albicans* [2, 4, 6].

В настоящее время фарнезол, как коммерческий препарат, может быть получен естественным путем, а также с помощью химического синтеза. Его выделяют из эфирных масел липового цвета, зерен мускуса, нероли, петитгрейна [7, 8]. У дрожжей фарнезол является побочным продуктом пути биосинтеза эргостерола, образующегося в результате ферментативного

дефосфорилирования фарнезилпирофосфата [9]. Ферменты этого пути кодируются генами ERG (эргостерол). У бактерий YisP (фитоенсинтаза/скваленсинтаза) действует как фосфатаза, катализируя образование фарнезилдифосфата. Вэнг с коллегами описали, что накопление фарнезилдифосфата может в будущем использоваться для промышленного производства фарнезола с помощью *Escherichia coli*. Они обнаружили, что PgpB (фосфатидатфосфатаза) и YbjG (ундекапренилдифосфатаза), две интегральные мембранные фосфатазы *E. coli*, которые могут гидролизовать фарнезилдифосфат в фарнезол [10]. Таким образом, крупномасштабное производство фарнезола может быть достигнуто с помощью химического синтеза и метаболической инженерии у прокариотов.

Цель работы – оценить модулирующее действие фарнезола на противогрибковую активность некоторых антимикотических препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

Клинические штаммы *C. albicans* 6 изолятов (C1–C6) были выделены от женщин с вульвовагинальным кандидозом (ВВК). Идентификацию микроорганизмов проводили с применением технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Германия). Достоверной считали идентификацию с показателем SCORE более 2000. Музейная культура (C7) № 10231 приобретена из Американской коллекции типовой культуры (ATCC). Колонии суточных культур *C. albicans* с агара Сабуро (Difco, Франция) смывали ФР (рН 7,0). Концентрацию ДПГ доводили до 0,5 по МакФарланду, что соответствует $1,5 \times 10^8$ клеток/мл.

Препараты

Фарнезол (Far) (транс, транс-фарнезол; Sigma-Aldrich, США), молярная масса фарнезола = 222,37 грамм/моль, масса вещества = 0,886 гр/мл, Ns – количество вещества в молях 4000 мкМ/мл. Мы использовали 3 концентрации фарнезола 100, 50 и 25 мкМ, разведение проводили в ФР (рН 7,0). Контролем служил ФР.

Для определения чувствительности ДПГ к антимикотическим препаратам «Нистатин» (NYS 50 µg), «Кетоконазол» (KET 10 µg), «Клотримазол» (CTR 10 µg), «Амфотерицин В» (AMB 10 µg), «Вориконазол» (VRC 10 µg) использовали диско-диффузионный метод.

Ход работы

1. На стерильные бумажные диски наносили 25 мкл ФР (PhS) + Far, что соответствовало концентрации фарнезола 100 мкМ.
2. На стерильные бумажные диски наносили 25 мкл PhS.
3. На диск с антимикотическим препаратом наносили 25 мкл PhS.

4. На диск с антимикотическим препаратом наносили 25 мкл Far с концентрацией 100 мкМ.
5. На диск с антимикотическим препаратом наносили 25 мкл Far с концентрацией 50 мкМ.
6. На диск с антимикотическим препаратом наносили 25 мкл Far с концентрацией 25 мкМ.

Учет результатов проводили путем измерения диаметра зоны подавления роста культуры ДПГ рода *Candida* под действием антимикотического препарата или его сочетания с фарнезолом в соответствии с протоколом NCCLS M-44.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс устойчивости/чувствительности к антимикотическим препаратам динамичен у разных изолятов ДПГ рода *Candida* и меняется с течением времени, это делает актуальным исследование в направлении поиска альтернативных путей модулирования активности антимикотических препаратов в отношении ДПГ рода *Candida*.

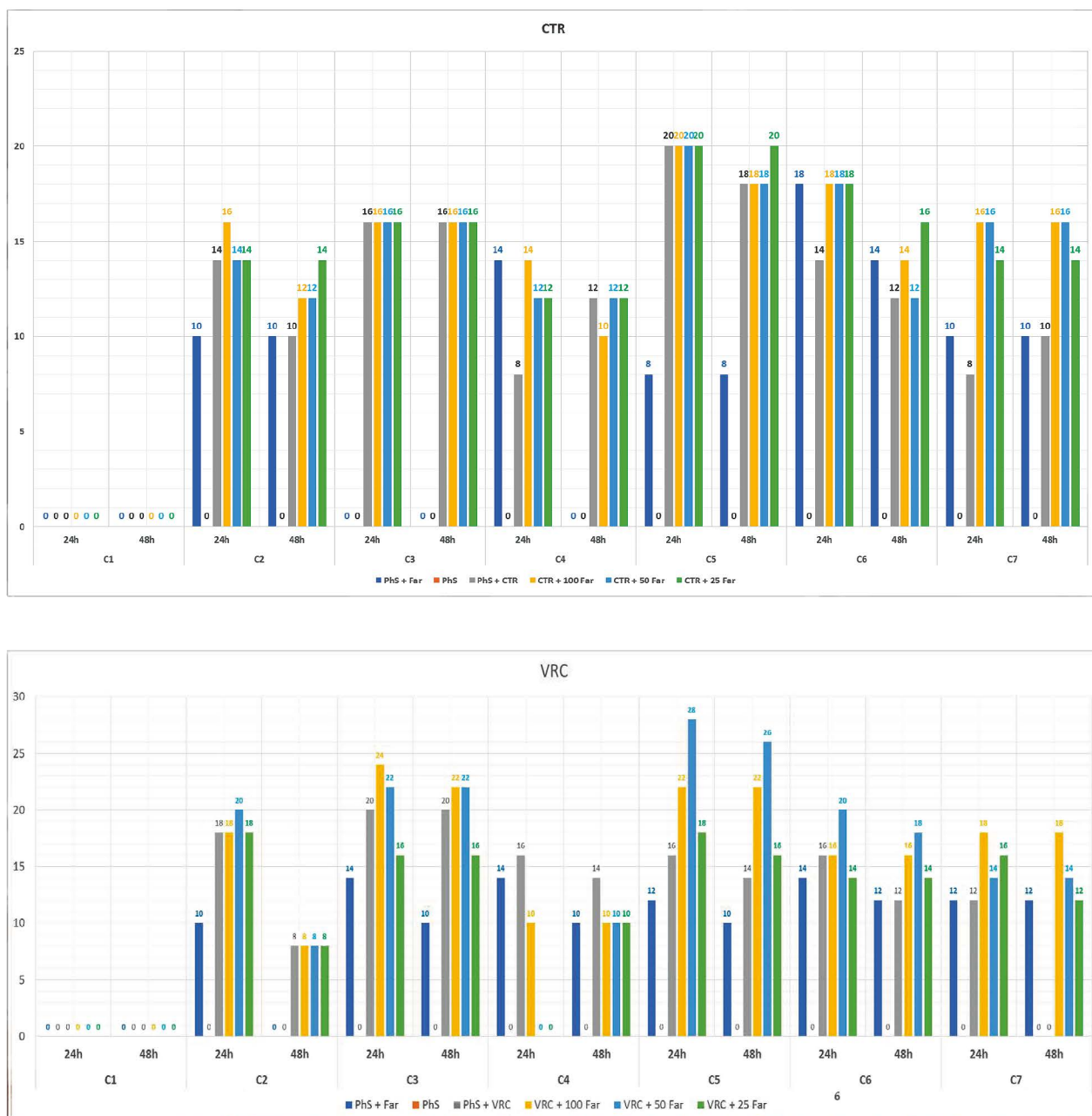
В результате микологического исследования штаммы ДПГ рода *Candida* характеризовались высокой устойчивостью к противогрибковым препаратам *in vitro*. Особенно клинический штамм C1 – он проявил резистентность ко всем пяти препаратам. У других шести штаммов уровни резистентности отличались как по группам препаратов, так и варьировали внутри групп. Синергическое действие фарнезола с полиеновыми антимикотическими препаратами было следующим: у 6 штаммов из 7 Far в концентрации 100 и 50 мкМ увеличивал чувствительность к нистатину, Far 25 мкМ – 4 из 7; и у 6 штаммов из 7 Far в концентрации 100 мкМ увеличивал чувствительность к амфотерицину В, 50 мкМ – на один меньше (т. е. у 5 штаммов из 7), 25 мкМ – 3 из 7 (рисунок 1).

Обращает на себя внимание вариабельность, наблюдаемая нами в группе имидазолов. Только у 2 штаммов, устойчивых к кетоконазолу, увеличилась чувствительность за счет фарнезола во всех трех концентрациях, а у 4 культур, наоборот, показатели ухудшились, у 1 из 7 – изменений не наблюдалось. У 3 устойчивых и умеренно устойчивых к клотримазолу штаммов профили резистентности за счет фарнезола улучшились, а у 4 – остались без изменений. В опыте с вориконазолом все неоднозначно: у 2 культур фарнезол увеличил чувствительность к антимикотическому препарату во всех 3 концентрациях, у ещё одного штамма с этой задачей справились лишь только первые две концентрации фарнезола – 100 и 50 мкМ. Резистентность других клинических изолятов оказалась достаточно высокой и фарнезол или не повлиял вовсе, или даже чуть ухудшил показатели. Важно отметить, что колонии по границе зоны задержки роста вокруг дисков с фарнезолом или антимикотик + фарнезол имели значительно меньший диаметр. В случае отрицательного результата данный феномен также наблюдался (рисунок 2).



Рисунок 1. Определение чувствительности к противогрибковым препаратам 7 штаммов *Candida albicans* и действие трех концентраций фарнезола на эти результаты

Figure 1. Determination of the sensitivity to antifungal drugs of 7 strains of *Candida albicans* and the effect of farnesol three concentrations on these results



Продолжение рисунка 1

Continuation of figure 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предыдущие данные *in vitro* свидетельствуют о том, что в сочетании с некоторыми противогрибковыми препаратами фарнезол может иметь адъювантный антимикотический эффект. Комбинации фарнезола с различными противогрибковыми средствами показали синергизм в отношении биопленок *C. parapsilosis* и *C. albicans* [11–14]. Например, метаболическая активность ДПГ была значительно ингибирована каспофунгином/фарнезолом во всех трех тестируемых комбинациях (4 мг/л + 75 мкМ, 8 мг/л + 75 мкМ и

16 мг/л + 75 мкМ) в период от 3 до 24 часов по сравнению с контролем [14].

Значительная синергия была обнаружена в комбинации фарнезол/микафунгин, в результате чего антимикотический препарат действовал на 39–52 % лучше, чем в контроле. Комбинированный эффект фарнезола зависел от его концентрации для микафунгина. Также синергизм наблюдался в паре фарнезол/флуконазол и отсутствие взаимодействия для фарнезола/амфотерицина В. Структурные изменения в клеточной стенке ДПГ хорошо коррелировали с эффективностью этих комбинаций [15].

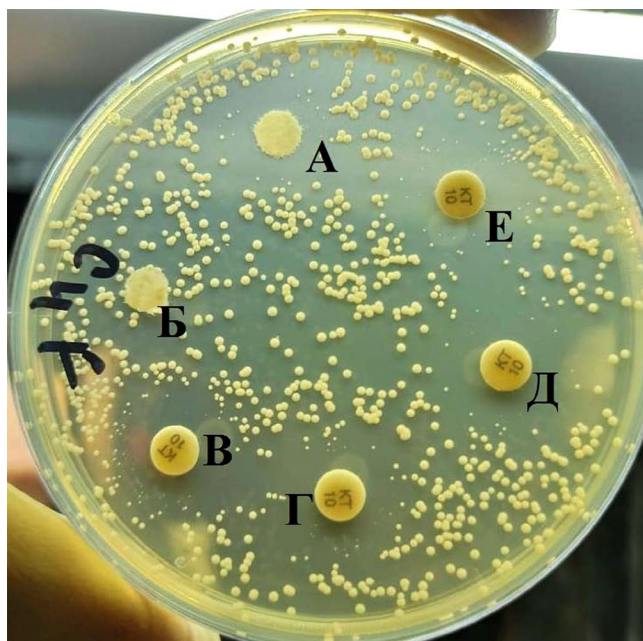


Рисунок 2. Феномен уменьшения диаметра колоний *Candida* вокруг дисков с фарнезолом и дисков с фарнезолом + кетоконазолом (KET 10 µg)

Figure 2. The phenomenon of decreasing the diameter of *Candida* colonies around disks with farnesol and disks with farnesol + ketoconazole (KET 10 µg)

Активность флуконазола в сочетании с фарнезолом *in vitro* оценивали в отношении биопленок *C. albicans*. Комбинация снижала метаболическую активность биопленок для всех изолятов в зависимости от концентрации препаратов и времени. В опыте использовали флуконазол 4–512 мг/л и фарнезол 150–300 мкМ. В результате фарнезол снизил медиану МИК флуконазола в 2–64 раза [16].

В нашем опыте мы показали, что фарнезол, безусловно, влияет на степень резистентности ДПГ, что указывает на его потенциальную роль в качестве антимикробного агента. Однако наши результаты показали, что профили резистентности штаммов *Candida* улучшаются за счет фарнезола далеко не у всех штаммов. В 12 случаях из 35 (7 × 5) можно однозначно говорить об фунгистатическом эффекте, т. е. увеличении чувствительности к препаратам, что составляет 34,3 % от общего числа экспериментов. Остальные 65,7 % случаев – это отсутствие каких-либо изменений в структуры устойчивости к противогрибковым препаратам или, в редких случаях, ухудшение показателей. Уникальный штамм С1, устойчивый ко всем пяти противогрибковым препаратам, в большинстве используемых комбинациях фарнезол + антимикотический препарат – проявил чувствительность к препарату.

Результаты данного исследования содержат полезную информацию для понимания механизма действия QS-молекул, обладающих противогрибковой ак-

тивностью, а также они являются обоснованием для практического применения некоторых QS-молекул в терапии инфекционных заболеваний, вызванных ДПГ рода *Candida*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singkum P., Muangkaew W., Suwanmanee S., Pumeesat P., Wongsuk T., Luplertlop N. Suppression of the pathogenicity of *Candida albicans* by the quorum-sensing molecules farnesol and tryptophol. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2020;65(6):277–283. DOI: 10.2323/jgam.2018.12.002.
2. Сачивкина Н. П., Ленченко Е. М., Марахова А. И. Исследование формирования биопленок *Candida albicans* и *Escherichia coli*. Фармация. 2019;68(7):26–30. DOI: 10.29296/25419218-2019-07-05.
3. Lu M., Li T., Wan J., Li X., Yuan L., Sun S. Antifungal effects of phytochemicals on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;49(2):125–136. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.10.021.
4. Ленченко Е. М., Сачивкина Н. П., Блюменкранц Д. А., Арсенюк Ю. А. Индикация биопленок микроорганизмов при болезнях органов пищеварения ягнят. *Ветеринария сегодня*. 2021;1(1):59–67. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-59-67.
5. Khan I. I., Parfait K., Sachivkina N. P. Comparison of different methods for determining the critical micell concentration. *Farmatsiya*. 2018;67(6):35–38. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-07.
6. Сачивкина Н. П., Ленченко Е. М., Маннапова Р. Т., Стрижков А. А., Романова Н. В., Лукина Д. М. Моделирование биопленок *Candida*: прошлое и настоящее. Фармация. 2019;68(3):18–22. DOI: 10.29296/25419218-2019-03-03.
7. Sachivkina N., Lenchenko E., Blumenkrantz D., Ibragimova A., Bazarkina O. Effects of farnesol and lyticase on the formation of *Candida albicans* biofilm. *Veterinary World*. 2020;13(6):1030–1036. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1030-1036.
8. Srivastava V., Ahmad A. Abrogation of pathogenic attributes in drug resistant *Candida auris* strains by farnesol. *PLOS ONE*. 2020;15(5):e0233102. DOI: 10.1371/journal.pone.0233102.
9. Riekhof W. R., Nickerson K. W. Quorum sensing in *Candida albicans*: farnesol versus farnesoic acid. *FEBS Letters*. 2017;591(12):1637–1640. DOI: 10.1002/1873-3468.12694.
10. Wang C., Park J.-E., Choi E.-S., Kim S.-W. Farnesol production in *Escherichia coli* through the construction of a farnesol biosynthesis pathway – application of PgpB and YbjG phosphatases. *Biotechnology Journal*. 2016;11(10):1291–1297. DOI: 10.1002/biot.201600250.
11. Lee J.-H., Kim Y.-G., Khadke S. K., Lee J. Antibiofilm and antifungal activities of medium-chain fatty acids against *Candida albicans* via mimicking of the quorum-sensing molecule farnesol. *Microbial Biotechnology*. 2021;14(4):1353–1366. DOI: 10.1111/1751-7915.13710.
12. Сачивкина Н. П., Подопригра И. В., Марахова А. И. Фарнезол: свойства, роль и перспективы использования при регулировании пленкообразования у грибов рода *Candida*. Фармация. 2020;69(6):8–12. DOI: 10.29296/25419218-2020-06-02.
13. Nickerson K. W., Atkin A. L. Deciphering fungal dimorphism: Farnesol's unanswered questions. *Molecular Microbiology*. 2017;103(4):567–575. DOI: 10.1111/mmi.13601.
14. Kovács R., Bozó A., Gesztelyi R., Domán M., Kardos G., Nagy F., Tóth Z., Majoros L. Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016;47(4):304–310. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.01.007.
15. Katragkou A., McCarthy M., Alexander E. L., Antachopoulos C., Meletiadis J., Jabra-Rizk M. A., Petrakis V., Roilides E., Walsh T. J. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(2):470–478. DOI: 10.1093/jac/dku374.
16. Bozó A., Domán M., Majoros L., Kardos G., Varga I., Kovács R. The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. *Journal of Microbiology*. 2016;54(11):753–760. DOI: 10.1007/s12275-016-6298-y.

REFERENCES

1. Singkum P., Muangkaew W., Suwanmanee S., Pumeesat P., Wongsuk T., Luplertlop N. Suppression of the pathogenicity of *Candida albicans* by the quorum-sensing molecules farnesol and tryptophol. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2020;65(6):277–283. DOI: 10.2323/jgam.2018.12.002.
2. Sachivkina N. P., Lenchenko E. M., Marakhova A. I. Study of the formation of *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2019;68(7):26–30. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-07-05.
3. Lu M., Li T., Wan J., Li X., Yuan L., Sun S. Antifungal effects of phytochemicals on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;49(2):125–136. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.10.021.
4. Lenchenko E. M., Sachivkina N. P., Blumenkrants D. A., Arsenyuk A. Yu. Visualization of microbial biofilms in case of digestive disorders in lambs. *Veterinariya segodnya = Veterinary Science Today*. 2021;1(1):59–67. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-59-67.
5. Khan I. I., Parfait K., Sachivkina N. P. Comparison of different methods for determining the critical micell concentration. *Farmatsiya*. 2018;67(6):35–38. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-07.
6. Sachivkina N. P., Lenchenko E. M., Mannapova R. T., Strizhakov A. A., Romanova E. V., Lukina D. M. *Candida* biofilm modeling: past and present. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2019;68(3):18–22. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-03-03.
7. Sachivkina N., Lenchenko E., Blumenkrants D., Ibragimova A., Bazarkina O. Effects of farnesol and lyticase on the formation of *Candida albicans* biofilm. *Veterinary World*. 2020;13(6):1030–1036. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1030-1036.
8. Srivastava V., Ahmad A. Abrogation of pathogenic attributes in drug resistant *Candida auris* strains by farnesol. *PLOS ONE*. 2020;15(5):e0233102. DOI: 10.1371/journal.pone.0233102.
9. Riekhof W. R., Nickerson K. W. Quorum sensing in *Candida albicans*: farnesol versus farnesoic acid. *FEBS Letters*. 2017;591(12):1637–1640. DOI: 10.1002/1873-3468.12694.
10. Wang C., Park J.-E., Choi E.-S., Kim S.-W. Farnesol production in *Escherichia coli* through the construction of a farnesol biosynthesis pathway – application of PgpB and YbjG phosphatases. *Biotechnology Journal*. 2016;11(10):1291–1297. DOI: 10.1002/biot.201600250.
11. Lee J.-H., Kim Y.-G., Khadke S. K., Lee J. Antibiofilm and antifungal activities of medium-chain fatty acids against *Candida albicans* via mimicking of the quorum-sensing molecule farnesol. *Microbial Biotechnology*. 2021;14(4):1353–1366. DOI: 10.1111/1751-7915.13710.
12. Sachivkina N. P., Podoprigora I. V., Marakhova A. I. Farnesol: properties, role, and prospects for use in the regulation of film formation in fungi of the genus *Candida*. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2020;69(6):8–12. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2020-06-02.
13. Nickerson K. W., Atkin A. L. Deciphering fungal dimorphism: Farnesol's unanswered questions. *Molecular Microbiology*. 2017;103(4):567–575. DOI: 10.1111/mmi.13601.
14. Kovács R., Bozó A., Gesztelyi R., Domán M., Kardos G., Nagy F., Tóth Z., Majoros L. Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016;47(4):304–310. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.01.007.
15. Katragkou A., McCarthy M., Alexander E. L., Antachopoulos C., Meletiadiis J., Jabra-Rizk M. A., Petratis V., Roilides E., Walsh T. J. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(2):470–478. DOI: 10.1093/jac/dku374.
16. Bozó A., Domán M., Majoros L., Kardos G., Varga I., Kovács R. The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. *Journal of Microbiology*. 2016;54(11):753–760. DOI: 10.1007/s12275-016-6298-y.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-169-176>
УДК 616.36-002:616.366-002



Оригинальная статья / Research article

Ретроспективный анализ экспериментального и клинического изучения флакозида при вирусных гепатитах

В. В. Карабаева¹, Л. В. Крепкова^{1*}, А. Н. Бабенко¹, В. В. Бортникова¹, Т. В. Фатеева¹,
П. Г. Мизина¹, Н. С. Михеева², О. Н. Карабаева³

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

² ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МГМСУ), 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

* Контактное лицо: Крепкова Любовь Вениаминовна. E-mail: krepkova2011@yandex.ru

ORCID: В. В. Карабаева – <https://orcid.org/0000-0002-0259-5306>; Л. В. Крепкова – <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>; А. Н. Бабенко – <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>;

В. В. Бортникова – <https://orcid.org/0000-0002-0393-1762>; Т. В. Фатеева – <https://orcid.org/0000-0002-8231-0621>; П. Г. Мизина – <https://orcid.org/0000-0001-6510-9603>;

Н. С. Михеева – <https://orcid.org/0000-0001-7494-2365>; О. Н. Карабаева – <https://orcid.org/0000-0003-4928-0894>.

Статья поступила: 28.07.2021

Статья принята в печать: 27.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Вирусные гепатиты (ВГ) по своей социально-экономической значимости занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии человека, поэтому разработка принципиально новых методов профилактики, диагностики и лечения, а также создание новых противовирусных лекарственных средств остаются актуальными. В ВИЛАР создан противовирусный лекарственный растительный препарат «Флакозид», который представлен в лекарственной форме – таблетки 0,1 г для приема внутрь.

Цель. Проанализировать экспериментальную и клиническую эффективность и безопасность терапии флакозидом при вирусных гепатитах.

Материалы и методы. Экспериментальное изучение влияния флакозида на вирусный гепатит А (ВГА). В работе использовали культуру клеток AGMK (линия BS-C-1) и адаптированный к ней штамм вируса гепатита А НМ 175. Исследования проведены в двух сериях экспериментов с использованием различных концентраций препарата, который вносили в культуры одновременно с заражением ВГА. Экспериментальное изучение влияния флакозида на вирусный гепатит С (ВГС). В настоящих опытах использовали вирусосодержащую культуральную жидкость, собранную из инфицированных культур фибробластов куриного эмбриона, содержащую 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл инфекционного ВГС (генотип 1b). Цитотоксическую, вирулицидную и противовирусную активности флакозида изучали с использованием перевиваемых культур клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), полученных из коллекции клеточных линий ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России. В опытах использовали однодневный монослой клеток, выращенный в 96-луночных пластиковых культуральных панелях. Определяли ИД₅₀ – концентрацию препарата «Флакозид», ингибирующую развитие вируса в монослой на 50 % и ЦД₅₀ – минимальную его концентрацию, вызывающую цитотоксическую деструкцию 50 % клеток монослоя, а также ХТИ – химиотерапевтический индекс, вычисляемый как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀. В качестве препарата сравнения использовали известное отечественное противовирусное средство – «Рибавирин». Клинические исследования флакозида при вирусном гепатите А. Результаты клинических исследований противовирусного препарата «Флакозид» (таблетки 0,1 г) проанализированы у 258 пациентов с вирусным гепатитом А. «Флакозид» назначали пациентам со среднетяжелым течением заболевания по 0,1 г 3 раза в сутки в течение 20 дней на фоне базисной терапии: диета, щелочное питье, Энтеродез®. Терапевтический эффект оценивали по клиническим (слабость, снижение аппетита, тошнота, рвота) и биохимическим показателям (уровень прямого билирубина, активность трансаминаз), а также по степени выраженности гепатолиенального синдрома. Клинические исследования флакозида при вирусном гепатите В. Результаты клинических исследований противовирусного препарата «Флакозид» (таблетки 0,1 г) проанализированы у 410 пациентов с острым вирусным гепатитом В, который расценивали как среднетяжелый. «Флакозид» назначали на фоне базисной терапии: диета и дезинтоксикационная терапия: 5 % раствор глюкозы, 5 % раствор аскорбиновой кислоты, «Гемодез», в суточной дозе 0,3–0,8 г до 38 дней. Группа сравнения получала такую же базисную терапию без флакозида. Оценивали динамику клинических симптомов (общая слабость, головная боль, нарушение сна, головокружения, тошнота, рвота, нарушение аппетита, зуд кожи, боли в правом подреберье, желтуха и др.), данные лабораторных методов обследования, определяли маркеры гепатита В – HBeAg и австралийский антиген (HBsAg) каждые 10 дней и показатели клеточного иммунитета до назначения и через 21 день лечения; определяли абсолютное число лимфоцитов, общее количество Т-лимфоцитов, а также количество теофиллинрезистентных и теофиллинчувствительных клеток.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментальных исследований выявили противовирусное действие флакозида в отношении вируса гепатита А, подтвержденное при проведении клинических исследований у взрослых пациентов. Лечение флакозидом пациентов с вирусным гепатитом А на фоне базисной терапии в суточной дозе 0,3 г в течение 20 дней приводило к достоверному снижению симптомов интоксикации, сокращению желтушного периода, нормализации размеров печени и селезенки. Лечение флакозидом в составе комплексной терапии пациентов с острым вирусным гепатитом В (ОВГ) средней тяжести в суточных дозах 0,3–0,8 г в течение 38 дней показало его высокую эффективность, способствуя более быстрому исчезновению клинических симптомов заболевания (улучшение общего состояния пациентов, уменьшение выраженности и исчезновение клинических симптомов интоксикации, сокращение желтушного периода), нормализации биохимических показателей (снижение уровня билирубина и активности трансаминаз), а также элиминации из крови HBsAg, стимуляции клеточного иммунитета. «Флакозид» хорошо переносился, не вызывал аллергических реакций. На основании результатов клинических исследований «Флакозид» разрешен для медицинского использования в качестве противовирусного средства (регистрационный номер 90/248/7). Установлена высокая противовирусная активность флакозида в отношении вируса гепатита С в культурах клеток. По степени выраженности лечебного эффекта «Флакозид» не уступал рибавирину, а по ХТИ заметно его превосходил.

Заключение. Лечение флакозидом пациентов с вирусными гепатитами А и В показало его высокую эффективность, способствовало более быстрому исчезновению клинических симптомов заболевания, нормализации биохимических показателей, элиминации из крови HBsAg, хорошую переносимость. «Флакозид» рекомендован в клинической практике в комплексном лечении гепатитов А и В. В опытах *in vitro* установлена высокая противовирусная активность флакозида в отношении вируса гепатита С, что обосновывает возможность проведения клинических исследований препарата у пациентов с вирусным гепатитом С.

© Карабаева В. В., Крепкова Л. В., Бабенко А. Н., Бортникова В. В., Фатеева Т. В., Мизина П. Г., Михеева Н. С., Карабаева О. Н., 2021

© Karabaeva V. V., Krepkova L. V., Babenko A. N., Bortnikova V. V., Fateeva T. V., Mizina P. G., Mikhееva N. S., Karabaeva O. N., 2021

Ключевые слова: «Флакозид», вирусный гепатит А, вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, экспериментальные и клинические исследования

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

Вклад авторов. В. В. Карабаева, Л. В. Крепкова, В. В. Бортникова инициировали и разработали план исследования. А. Н. Бабенко, Т. В. Фатеева, Н. С. Михеева, О. Н. Карабаева собрали и проанализировали клинические данные. В. В. Карабаева, П. Г. Мизина, Л. В. Крепкова разработали концепцию и дизайн рукописи. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Карабаева В. В., Крепкова Л. В., Бабенко А. Н., Бортникова В. В., Фатеева Т. В., Мизина П. Г., Михеева Н. С., Карабаева О. Н. Ретроспективный анализ экспериментального и клинического изучения флакозида при вирусных гепатитах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):169–176. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-169-176>

Retrospective Analysis of Experimental and Clinical Studies of Flakozid in Viral Hepatitis

Vera. V. Karabaeva¹, Lubov' V. Krepkova^{1*}, Aleksandra N. Babenko¹, Valentina V. Bortnikova¹, Tatyana V. Fateeva¹, Praskovya G. Mizina¹, Natalya S. Mikheeva², Ol'ga N. Karabaeva³

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1, Greena str., Moscow, 117216, Russia

² Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russia

³ A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia

*Corresponding author: Lubov' V. Krepkova. E-mail: krepkova2011@yandex.ru

ORCID: Vera. V. Karabaeva – <https://orcid.org/0000-0002-0259-5306>; Lubov' V. Krepkova – <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>;

Aleksandra N. Babenko – <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>; Valentina V. Bortnikova – <https://orcid.org/0000-0002-0393-1762>;

Tatyana V. Fateeva – <https://orcid.org/0000-0002-8231-0621>; Praskovya G. Mizina – <https://orcid.org/0000-0001-6510-9603>;

Natalya S. Mikheeva – <https://orcid.org/0000-0001-7494-2365>; Ol'ga N. Karabaeva – <https://orcid.org/0000-0003-4928-0894>.

Received: 28.07.2021

Revised: 27.10.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Viral hepatitis (HV) by its socio-economic significance occupies one of the leading places in human infectious pathology, therefore, the development of fundamentally new methods of prevention, diagnosis and treatment, as well as the creation of new antiviral drugs remain relevant. An antiviral herbal drug "Flakozid" has been created in VILAR, which is presented in a dosage form – 0,1 g tablets for oral administration.

Aim. To analyze the experimental and clinical efficacy and safety of flakozid therapy in viral hepatitis.

Materials and methods. Experimental study of the effect of flakozid on viral hepatitis A (HAV). The AGMK cell culture (BS-C-1 line) and the hepatitis A virus strain HM 175 adapted to it were used in the work. The studies were conducted in two series of experiments using different concentrations of the drug, which was introduced into cultures simultaneously with the infection of HAV. Experimental study of the effect of flakozid on viral hepatitis C (HCV). In the present experiments, a virus-containing culture fluid collected from infected cultures of chicken embryo fibroblasts containing 7,0 lg TCD₅₀/ml of infectious HCV (genotype 1b) was used. The cytotoxic, viricidal and antiviral activity of flakozid was studied using transplanted cultures of pig embryo kidney cells (SPEV) obtained from the collection of cell lines of the D. I. Ivanovsky Research institute of virology of the Ministry of Health of the Russian Federation. In the experiments, a one-day monolayer of cells grown in 96-well plastic culture panels was used. ID₅₀ – the concentration of the drug "Flakozid", which inhibits the development of the virus in the monolayer by 50 %, and CD₅₀ – its minimum concentration, which causes cytotoxic destruction of 50 % of the cells of the monolayer, as well as the CTI – chemotherapeutic index, calculated as the ratio of CD₅₀ to ID₅₀, were determined. A well – known domestic antiviral agent, "Ribavirin", was used as a comparison drug. Clinical studies of flakozid in viral hepatitis A. The results of clinical studies of the antiviral drug "Flakozid" (0,1 g tablets) were analyzed in 258 patients with viral hepatitis A. "Flakozid" was prescribed to patients with a moderate course of the disease, 0,1 g 3 times a day for 20 days against the background of basic therapy: diet, alkaline drinking, Enterodes®. The therapeutic effect was assessed by clinical (weakness, decreased appetite, nausea, vomiting) and biochemical parameters (the level of direct bilirubin, transaminase activity), as well as by the severity of hepatolienal syndrome. Clinical studies of flakozid in viral hepatitis B. The results of clinical studies of the antiviral drug "Flakozid" (0,1 g tablets) were analyzed in 410 patients with acute viral hepatitis B, which was regarded as moderate. "Flakozid" was prescribed against the background of basic therapy: diet and detoxification therapy: 5 % glucose solution, 5 % ascorbic acid solution, "Hemodesi", at a daily dose of 0,3–0,8 g for up to 38 days. The comparison group received the same basic therapy without flakozid. The dynamics of clinical symptoms (general weakness, headache, sleep disorders, dizziness, nausea, vomiting, impaired appetite, itchy skin, pain in the right hypochondrium, jaundice, etc.), data from laboratory examination methods were evaluated, markers of hepatitis B – HBeAg and Australian antigen (HBsAg) were determined every 10 days and indicators of cellular immunity before the appointment and after 21 days of treatment; the absolute number of lymphocytes, the total number of T-lymphocytes, as well as theophylline-resistant and theophylline-sensitive cells.

Results and discussion. The results of experimental studies revealed the antiviral effect of flakozid against the hepatitis A virus, confirmed during clinical studies in adult patients. Treatment with flakozid in patients with viral hepatitis A against the background of basic therapy at a daily dose of 0,3 g for 20 days led to a significant reduction in the symptoms of intoxication, a reduction in the jaundice period, normalization of the size of the liver and spleen. Treatment with flakozid as part of complex therapy of patients with acute viral hepatitis B (AHVB) of moderate severity in daily doses of 0,3–0,8 g for 38 days showed its high effectiveness, contributing to a faster disappearance of clinical symptoms of the disease (improvement of the general condition of patients, reduction of the severity and disappearance of clinical symptoms of intoxication, reducing of the jaundice period), normalization of biochemical parameters (reducing the level of bilirubin and transaminase activity), as well as elimination of HBsAg from the blood, stimulation of cellular immunity. "Flakozid" was well tolerated, did not cause allergic reactions. Based on the results of clinical studies, "Flakozid" is approved for medical use as an antiviral agent (registration number 90/248/7). The high antiviral activity of flakozid against the hepatitis C virus in cell cultures was established. In terms of the severity of the therapeutic effect, "Flakozid" was not inferior to ribavirin, and in terms of CTI it was noticeably superior.

Conclusion. Treatment with flakozid in patients with viral hepatitis A and B showed its high efficiency, contributed to a faster disappearance of clinical symptoms of the disease, normalization of biochemical parameters, elimination of HCV from the blood, good tolerability. "Flakozid" is recommended in clinical practice in the complex treatment of hepatitis A and B. In vitro experiments have established a high antiviral activity of flakozid against the hepatitis C virus, which justifies the possibility of conducting clinical studies of the drug in patients with the viral hepatitis C.

Keywords: "Flakozid", viral hepatitis A, viral hepatitis B, viral hepatitis C, experimental and clinical studies

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

Contribution of the authors. Vera V. Karabaeva, Lubov' V. Krepkova, Valentina V. Bortnikova initiated and developed a research plan. Aleksandra N. Babenko, Tatyana V. Fateeva, Natalya S. Mikheeva, Ol'ga N. Karabaeva collected and analyzed clinical data. Vera V. Karabaeva, Praskovya G. Mizina, Lubov' V. Krepkova developed the concept and design of the manuscript. All the authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Karabaeva V. V., Krepkova L. V., Babenko A. N., Bortnikova V. V., Fateeva T. V., Mizina P. G., Mikheeva N. S., Karabaeva O. N. Retrospective analysis of experimental and clinical studies of flakozid in viral hepatitis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):169–176. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-169-176>

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные гепатиты (ВГ) являются опасными для жизни заболеваниями и по своей социально-экономической значимости занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии человека, что определяется преимущественным поражением лиц трудоспособного возраста, формированием хронических форм болезни с исходами в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному, высокой смертностью [1–7].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), предположительно, 325 миллионов человек в мире живут с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ) или вирусом гепатита С (ВГС) [2]. Профилактика и лечение вирусных гепатитов требуют безотлагательных мероприятий, которые сводятся к применению вакцин и использованию высокоэффективных противовирусных препаратов прямого действия [2–12].

В России проблема вирусных гепатитов также относится к числу наиболее актуальных. На территории Российской Федерации проживают более 3 млн больных с хроническим гепатитом В (ХГВ), количество больных хроническим гепатитом С (ХГС) варьирует от 1,5 до 2,5 млн человек. Заболеваемость острым гепатитом В (ОГВ) в 2017 году составила 0,87 на 100 тыс. населения. Несмотря на то, что показатели заболеваемости ОГВ снизились до самых низких значений за всю историю регистрации, в том числе за счет проводимых мер профилактики, отмечаются стабильно высокие уровни заболеваемости впервые выявленных хронических форм ВГВ и ВГС. Учитывая такую тенденцию можно ожидать увеличение числа пациентов с циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК). По данным некоторых авторов вирусные гепатиты ежегодно являются причиной гибели не менее 20 тыс. человек, причем смертность от этой патологии с 2012 по 2016 г. возросла среди всего населения на 40 %, а среди трудоспособного – на 60 % [3, 8–11].

В 2020 году заболеваемость вирусным гепатитом А (ВГА) характеризовалась тенденцией к снижению: показатель составил 1,89 на 100 тыс. населения, а в 2019 году – 2,88. Вместе с тем незначительное количество лиц, ежегодно вакцинируемых в России, недостаточно для обеспечения контроля за возникнове-

нием и распространением ВГА. [13]. В отличие от гепатита ВГВ гепатит ВГА не имеет хронической формы заболевания печени, но может привести к острой печеночной недостаточности [3, 11, 12].

Наряду с проведением комплексных организационных, гигиенических и противоэпидемических мероприятий разработка принципиально новых методов диагностики, лечения и профилактики позволяет приступить к глобальному контролю заболеваемости вирусными гепатитами.

Основная цель терапии вирусных гепатитов – снижение вирусной нагрузки, уменьшение некровоспалительных изменений в печени для замедления печеночного фиброза, прогрессирования болезни в цирроз, предотвращение появления опасных для жизни состояний – развития терминального поражения печени, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) – и, как следствие, повышение качества и продолжительности жизни пациента.

За последние годы быстрый прогресс в разработке новых подходов к лечению хронических вирусных гепатитов обеспечил возможность излечивать хронический гепатит С более чем у 90 % пациентов и успешно контролировать хроническую инфекцию, вызванную вирусом гепатита В, посредством подавления репликации вируса и снизить заболеваемость и смертность, связанную с вирусными гепатитами.

В настоящее время практическая медицина обладает достаточным количеством противовирусных средств, способных подавлять репродукцию вируса на любой стадии процесса. Однако, несмотря на определенные успехи, достигнутые в вирусной химиотерапии, клиническая практика сталкивается с серьезными проблемами – невозможностью обеспечить эффективное химиотерапевтическое действие в месте репродукции вируса, токсическими эффектами многих препаратов, а также развитию резистентности к уже применяющимся лекарственным средствам [14, 15].

Одним из перспективных направлений в создании противовирусных лекарственных средств является их разработка на основе лекарственного растительного сырья путем выделения индивидуальных биологически активных веществ с доказанной противовирусной активностью.

Изучение лекарственных препаратов растительного происхождения, обладающих противовирусными свойствами, таких как «Алпизарин», «Эпиген», «Гипорамин», «Госсипол», показало наличие у них противовирусного и иммуномодулирующего действия и отсутствие резистентности вирусов к данным лекарственным средствам [16].

Экспериментальные исследования, проведенные сотрудниками ВИЛАР на протяжении нескольких лет, завершились созданием отечественного противовирусного препарата «Флакозид». У флакозида установлена противовирусная активность в отношении возбудителей гепатита А, В и С, простого рецидивирующего герпеса, опоясывающего лишая, ветряной оспы, кори. Кроме того, у препарата доказано гепатопротекторное действие, обусловленное мембраностабилизирующими и противовоспалительными свойствами. «Флакозид» проявляет иммуностимулирующее действие в отношении гуморального звена иммунитета, а также стимулирует индукцию гамма-интерферона [17–19]. Лекарственный препарат разрешен для медицинского применения в виде таблеток 0,1 г для приема внутрь.

Целью наших исследований явился ретроспективный анализ результатов экспериментального и клинического исследования флакозида при вирусных гепатитах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. «Флакозид» – индивидуальный природный флавоноидный гликозид – феллавин. Источником получения флакозида являются листья бархата амурского – *Phellodendron amurense* Rupr. и бархата Лавалля – *Phellodendron amurense* var. *Lavallei* (Dode) Sprague семейства Рутовые – *Rutaceae*.

Экспериментальное изучение влияния флакозида на ВГА. В работе использовали культуру клеток AGMK (линия BS-C-1) и адаптированный к ней штамм вируса гепатита А НМ 175. Исследования проведены в двух сериях экспериментов с использованием различных концентраций препарата, который вносили в культуры одновременно с заражением ВГА [20, 21].

Экспериментальное изучение влияния флакозида на ВГС. Штамм ВГС (генотип 1b) выделен с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени из сыворотки крови пациентки, хронически инфицированной вирусом гепатита С, в сыворотке крови которой обнаруживали антитела к ВГС (РТ-ПЦР – РНК ВГС). Для выделения вируса использовали первичные культуры клеток головного мозга мышей-сосунков. В последствии вирус приобрел способность размножаться в культурах клеток человека и животных, индуцируя цитопатогенный эффект в этих культурах и накапливаясь в них в титрах до $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ [22]. В настоящих опытах использовали вирусосодержащую культуральную жидкость, собранную из инфицированных культур фибробластов куриного эмбриона, содержащую $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ин-

фекционного ВГС (генотип 1b). С целью изучения цитотоксической, вирулицидной и противовирусной активности флакозида использовали перевиваемые культуры клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), полученные из коллекции клеточных линий ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России. В опытах использовали однодневный монослой клеток, выращенный в 96-луночных пластиковых культуральных панелях. Линия клеток СПЭВ является высокочувствительной для репликации ВГС генотипа 1b, который вызывает выраженный цитопатогенный эффект в этих культурах и накапливается в них к 5–6-м суткам после заражения в инфекционных титрах до $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{клетка}$ (тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50 % клеток монослоя). О противовирусной активности флакозида судили по его способности защищать инфицированные ВГС культуры клеток СПЭВ от цитопатогенного действия вируса. По данным опытов определяли ИД_{50} – концентрацию препарата «Флакозид», ингибирующую развитие вируса в монослое на 50 % и ЦД_{50} – минимальную его концентрацию, вызывающую цитотоксическую деструкцию 50 % клеток монослоя. Определяли ХТИ – химиотерапевтический индекс, вычисляемый как отношение ЦД_{50} к ИД_{50} . В качестве препарата сравнения использовали известное отечественное противовирусное средство – «Рибавирин» [20, 22].

Клинические исследования флакозида при вирусном гепатите А

Клинические исследования флакозида в качестве противовирусного средства при вирусном гепатите А проведены в 3 клинических учреждениях – Российскую медицинскую академию последипломного образования (РМАПО), на кафедре инфекционных болезней; 2-м МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, на кафедре клинической фармакологии; Челябинской государственной медицинской академии – с участием 258 пациентов с вирусным гепатитом А [174 человека: 89 (51,1 %) мужчин и 85 (48,9 %) женщин, средний возраст которых составил 27 (18; 60) лет – основная группа, и 84 человека: 49 (58,3 %) мужчин и 35 (47,6 %) женщин, средний возраст – 29 (18; 60) лет – группа контроля]. Пациенты поступали с типичной клинической картиной заболевания: наличием желтухи, интоксикации, гепатоспленомегалии, гипербилирубинемии и гипертрансфераземии. «Флакозид» получали 174 пациента со среднетяжелым течением заболевания, сопровождающимся желтухой, по 0,1 г 3 раза в сутки в течение 20 дней на фоне базисной терапии: диета, щелочное питье, Энтеродез®. Терапевтический эффект оценивали по клиническим (слабость, снижение аппетита, тошнота, рвота и т. д.) и биохимическим показателям (уровень прямого билирубина, активность трансаминаз), а также по степени выраженности гепатолиенального синдрома.

Клинические исследования флакозида при вирусном гепатите В

Результаты клинических исследований флакозида (таблетки 0,1 г) проанализированы у 410 пациентов с острым вирусным гепатитом В, проведенные в 4 клинических учреждениях: Российской медицинской академии последипломного образования (РМАПО), на кафедре инфекционных болезней; Челябинской государственной медицинской академии; Санкт-Петербургском институте усовершенствования врачей-экспертов; ФБУН ЦНИИ эпидемиологии. Пациенты были распределены на 2 равноценные группы: основную [210 пациентов: из них 121 (57,6 %) мужчин и 89 (42,4 %) женщин, средний возраст которых составил 27,1 (18; 60) года] и группу контроля – 200 человек: 114 (57,0 %) мужчин и 86 (43,0 %) женщин, средний возраст 24,3 (18; 60) года. Острый вирусный гепатит В расценивали, как среднетяжелый (выраженная интоксикация, желтуха, гепатоспленомегалия, высокая цитолитическая активность). При распределении больных использовали принцип рандомизации с распределением больных на группы по случайному признаку. «Флакозид» назначали 210 пациентам основной группы в суточных дозах 0,3–0,8 г до 38 дней на фоне базисной терапии: диета с достаточным количеством белков, углеводов, легко эмульгируемых жиров; и дезинтоксикационной терапии: 5%-й раствор глюкозы, 5%-й раствор аскорбиновой кислоты, «Гемодез». Группа сравнения получала такую же базисную терапию без флакозида. Оценивали динамику клинических симптомов (общая слабость, головная боль, нарушение сна, головокружения, тошнота, рвота, нарушение аппетита, зуд кожи, боли в правом подреберье, желтуха и др.), данные лабораторных методов обследования, определяли маркеры гепатита В – HBeAg и австралийский антиген (HBsAg), (Anti-HBc IgM AT – антитела к HBs класса IgM – характеризующие его репликативную активность) каждые 10 дней и показатели клеточного иммунитета до назначения и через 21 день лечения. Определяли абсолютное число лимфоцитов, общее количество Т-лимфоцитов, а также теофиллин-резистентных и теофиллинчувствительных клеток.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Достоверность различий с контролем считали при $P < 0,05$. Статистические данные обрабатывали с помощью программы Statistica version 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение влияния флакозида на вирус гепатита А в культурах клеток.

В обеих сериях опытов, результаты которых были опубликованы ранее [19, 21], установлено, что «Флакозид» подавлял размножение вируса гепатита А в культурах клеток AGMK (линия BS-C-1) и адапти-

рованный к ней штамм вируса гепатита А НМ 175 по сравнению с зараженными культурами, необработанными этим препаратом. При учете результатов методом непрямой иммунофлюоресценции «Флакозид» в концентрации 0,1 мг/мл вызывал ингибирование размножения ВГА на 30–35 % при внесении препарата в культуру одновременно с заражением вирусом гепатита А. При учете результатов иммуноферментным методом также установлено, что «Флакозид» ингибировал размножение ВГА в концентрациях 1, 0,5 и 0,1 мг/мл в тех случаях, когда препарат вносили в культуры одновременно с ВГА. Ни в одной из примененных концентраций цитотоксического действия препарата не наблюдали. Таким образом, было показано противовирусное действие флакозида в отношении вируса гепатита А [19, 21].

2. Изучение влияния флакозида на вирус гепатита С в культурах клеток.

Ранее проведенные исследования показали, что цитотоксические свойства флакозида для культур клеток СПЭВ слабо выражены. CD_{50} соответствует концентрации препарата, равной 100 мкг/мл, что сравнимо с данными, полученными при изучении цитотоксической активности препарата сравнения – рибавирина для культур клеток СПЭВ [18].

Результаты исследования вирулицидной активности флакозида свидетельствуют о том, что проявления указанной активности в отношении вируса гепатита С у препарата не выявлено, как и у рибавирина [18].

Исследования противовирусной активности флакозида показали, что внесение препарата за 24 часа до заражения, в момент заражения и через 24 часа после заражения монослоя клеток вирусом гепатита С, приводило к выраженному эффекту защиты клеток от цитопатогенного действия вируса, причем максимальный эффект флакозида наблюдали в случае обработки клеток до заражения вирусом гепатита С. Благодаря низкой цитотоксической активности «Флакозид» характеризовался высоким химиотерапевтическим индексом (ХТИ), который был установлен нами ранее [18]. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения противовирусной активности флакозида в комплексной терапии гепатита С.

3. Клинические исследования флакозида при вирусном гепатите А.

Лечение флакозидом пациентов с вирусным гепатитом А на фоне базисной терапии в суточной дозе по 0,3 г в течение 20 дней приводило к достоверному снижению симптомов интоксикации. Длительность желтушного периода у пациентов, получавших «Флакозид», составила 19 дней в отличие от 24 дней в группе контроля. При лечении флакозидом размеры печени и селезенки нормализовались к 15-му дню, а в контрольной группе – к 31-му дню. Содержание прямого билирубина у пациентов после терапии флакозидом снизилось с $96,3 \pm 7,3$ мкмоль/л

до $65,3 \pm 6,5$ мкмоль/л ($P < 0,05$), в контрольной группе до $88,9 \pm 6,8$ мкмоль/л ($P > 0,05$); активность аланинтрансаминазы (АлАТ) и аспартаттрансаминазы (АсАТ) – с 236 ± 6 нмоль/л до 84 ± 11 нмоль/л ($P < 0,05$) и до 160 ± 5 нмоль/л ($P < 0,05$) в контрольной группе, и с 159 ± 3 нмоль/л до 100 ± 9 нмоль/л ($P < 0,05$) при 140 ± 7 нмоль/л у пациентов группы контроля соответственно.

4. Клинические исследования флакозида при вирусном гепатите В.

В результате лечения флакозидом в составе комплексной терапии пациентов с острым вирусным гепатитом В (ОВГ) средней тяжести отмечено выраженное действие на клиническое течение заболевания: быстрое уменьшение выраженности и исчезновение клинических симптомов интоксикации на $4,1 \pm 0,4$ день, в контрольной группе – на $6,3 \pm 0,5$ день ($P < 0,05$); улучшение общего состояния пациентов, сокращение продолжительности желтушного периода до $12,4 \pm 1,5$ дней, а в группе контроля – до $17,8 \pm 2,0$ дней ($P > 0,05$).

При исследовании биохимических показателей и активности некоторых ферментов сыворотки крови до и после лечения флакозидом в течение 3 недель отмечали снижение уровня общего билирубина в 5,9 раз (с $153,3 \pm 22,3$ мкмоль/л до $25,8 \pm 2,7$ мкмоль/л), в контрольной группе – в 4,0 раза (с $146,1 \pm 17,6$ мкмоль/л до $36,8 \pm 2,8$ мкмоль/л) ($P < 0,05$); тимоловой пробы в 2,2 раза (с 9,1 Ед до 4,1 Ед); активности аланинтрансаминазы (АлАТ) на 89,6 %, которая достигла нормы и составила 35 ± 4 Е/л по сравнению с исходным показателем – 336 ± 26 Е/л, в контрольной группе этот показатель уменьшился на 73,8 % и составил 57 ± 8 Е/л ($P < 0,05$). Активность гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) уменьшилась на 65,7 % (с $176,5 \pm 5,7$ Е/л до $60,6 \pm 10,3$ Е/л) ($P < 0,05$) по сравнению с исходными данными. В контрольной группе этот показатель снизился на 34,6 % (с $164,1 \pm 11,9$ Е/л до $107,3 \pm 11,2$ Е/л) ($P < 0,05$). Белковый спектр сыворотки крови у пациентов с ВГВ, в лечении которых использовали «Флакозид», характеризовался достоверным понижением уровня гамма-глобулина с $24,4 \pm 0,6$ % до $13,7 \pm 0,5$ % ($P < 0,05$) и повышением содержания общего белка с $61,3 \pm 1,8$ г/л до $63,8 \pm 1,8$ г/л (в контрольной группе с $55,0 \pm 1,7$ г/л до $66,7 \pm 1,1$ г/л) и альбумина – с $51,6 \pm 1,5$ % до $51,9 \pm 1,4$ % в основной группе и с $45,6 \pm 1,3$ % до $50,2 \pm 0,9$ % в контрольной группе ($P < 0,05$), что свидетельствовало об улучшении белково-синтетической функции печени.

Комплексная оценка серологических маркеров вируса гепатита В показала, что в разгар заболевания антиген HBsAg был обнаружен у 97 % пациентов основной группы и у 90 % – контрольной группы. Применение флакозида в комплексной терапии ВГВ на 10 сутки лечения в основной группе маркер активности вируса гепатита В (HBsAg) был обнаружен у 84,8 % пациентов, а в контрольной группе –

у 81,7 % ($P > 0,05$). На 20 сутки лечения флакозидом установлено статистически достоверное различие по количеству выявлений указанного антигена между основной и контрольной группами: 68,2 % (основная группа) и 76,7 % (контрольная группа) ($P < 0,05$). Через 10 дней после отмены флакозида антиген HBsAg был выявлен у 53 % пациентов основной группы и у 61 % пациентов контрольной группы ($P < 0,05$).

Антиген вируса гепатита В – HBeAg, был обнаружен у 22 (10,4 %) пациентов основной группы и у 13 (6,5 %) пациентов контрольной группы. Определение содержания anti-HBc IgM антител (АТ) проводилось в те же сроки, что и индикация HBeAg. Anti-HBc IgM АТ до лечения флакозидом были выявлены у 92,4 % пациентов, а в контрольной группе – у 90,3 % пациентов. После лечения флакозидом anti-HBc IgM АТ были обнаружены у всех (100 %) пациентов, а в контрольной группе – у 96,7 % пациентов. Это свидетельствует, что под действием флакозида не изменилась частота выявления anti-HBc IgM АТ в крови пациентов основной группы.

До лечения флакозидом у пациентов отмечали угнетение клеточного иммунитета: существенное снижение абсолютного числа лимфоцитов в основной группе до $1,2 \pm 0,17 \cdot 10^9$ /л, в контрольной группе – $1,5 \pm 0,16 \cdot 10^9$ /л, общего количества Т-лимфоцитов, т-офиллинрезистентных и т-офиллинчувствительных клеток. После 21-дневного лечения флакозидом наблюдали нормализацию показателей Т-клеточного иммунитета: увеличение абсолютного количества лимфоцитов до $1,8 \pm 0,19 \cdot 10^9$ /л у пациентов основной группы, в контрольной группе – до $1,9 \pm 0,17 \cdot 10^9$ /л, ($P < 0,05$), в том числе Т-лимфоцитов до $0,98 \pm 0,10 \cdot 10^9$ /л, особенно т-офиллинчувствительных лимфоцитов до $0,32 \pm 0,04 \cdot 10^9$ /л, которые являются иммунорегулирующими клетками. Полученные данные позволяют сделать вывод о стимулирующем влиянии флакозида на показатели клеточного иммунитета у пациентов с острым вирусным гепатитом В.

При проведении клинических исследований флакозида в комплексной терапии ВГА и ВГВ ни у одного из пациентов не выявлено ухудшения общего состояния и каких-либо нежелательных побочных эффектов по клинико-лабораторным показателям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментальных исследований установили противовирусное действие флакозида в отношении вируса гепатита А, подтвержденное при проведении клинических исследований у взрослых пациентов.

Лечение флакозидом пациентов с вирусным гепатитом В показало его высокую эффективность, способствуя более быстрому исчезновению клинических симптомов заболевания, нормализации биохимических показателей, элиминации из крови антигена

HBsAg. «Флакозид» оказывал стимулирующее влияние на клеточный иммунитет. «Флакозид» хорошо переносился, не вызывал каких-либо нежелательных побочных проявлений общего или местного, в том числе аллергического характера. На основании результатов клинических исследований «Флакозид» разрешен для медицинского использования в качестве противовирусного средства (регистрационный номер 90/248/7) [19].

Высокая противовирусная активность флакозида в отношении вируса гепатита С, установленная в опытах *in vitro*, обосновывает возможность проведения клинических исследований препарата у пациентов с вирусным гепатитом С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фазылов В. Х. Этиологические и патогенетические аспекты диагностики и лечения вирусных гепатитов. *Казанский медицинский журнал*. 2013;94(6):785–792. DOI: 10.17816/KMJ1791.
2. Косаговская И. И., Волчкова Е. В. Медико-социальные аспекты вирусных гепатитов с парентеральным путем передачи. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013;18(1):28–39. DOI: 10.17816/EID40715.
3. Михайлов М. И., Ющук Н. Д., Малинникова Е. Ю., Кюрегян К. К., Исаева О. В., Знойко О. О., Климова Е. А. Вирусные гепатиты – проблема общественного здоровья в Российской Федерации (проект программы по контролю и ликвидации вирусных гепатитов). *ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучение. Вестник ВШОУЗ*. 2018;2(12):20–29.
4. Azeem H. A., Alkabeer A. M., Mohammed A. S. Study of hepatitis B virus infection, reactivation among patients with chronic hepatitis C infection treated by direct antiviral agents (DAAs). *Egyptian Liver Journal*. 2021;11:53. DOI: 10.1186/s43066-021-00121-8.
5. Miguere M., Lhomme S., Izopet J. Hepatitis A: Epidemiology, High-Risk Groups, Prevention and Research on Antiviral Treatment. *Viruses*. 2021;13(10):1900. DOI: 10.3390/v13101900.
6. Westermann C., Wendeler D., Nienhaus A. Hepatitis C in healthcare personnel: follow-up analysis of treatments with direct-acting antiviral agents. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2021;16:34. DOI: 10.1186/s12995-021-00320-4.
7. Pintó R. M., Pérez-Rodríguez F.-J., Costafreda M.-I., Chavarria-Miró G., Guix S., Ribes E., Bosch A. Pathogenicity and virulence of hepatitis A virus. *Virulence*. 2021;12(1):1174–1185. DOI: 10.1080/21505594.2021.1910442.
8. Abutaleb A., Kottail S. Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2020;49(2):191–199. DOI: 10.1016/j.gtc.2020.01.002.
9. Sharapov U. M., Hu D. J. Viral hepatitis A, B, and C: grown-up issues. *Adolesc Med State Art Rev*. 2010;21(2):265–286.
10. Kanda T., Sasaki R., Masuzaki R., Takahashi H., Mizutani T., Matsumoto N., Nirei K., Moriyama M. Co-Occurrence of hepatitis A infection and chronic liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6384. DOI: 10.3390/ijms21176384.
11. Pardee M. Diagnosis and Management of Hepatitis B and C. *Nursing Clinics of North America*. 2019;54(2):277–284. DOI: 10.1016/j.cnur.2019.02.004.
12. Чуелов С. Б., Россина А. Л., Учайкин В. Ф. Этиотропная терапия вирусных гепатитов. *Детские инфекции*. 2017;16(3):32–40. DOI: 10.22627/2072-8107-2017-16-3-32-40.
13. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2021. 256 с. Доступно по: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266. Ссылка активна на 05.07.2021.

14. Шульженко А. Е. Герпетические инфекции человека. Перспективы диагностики и противовирусной терапии. *Цитокины и воспаление*. 2005;4(3):76–81.
15. Sagnelli E., Pisaturo M., Martini S., Sagnelli C., Filippini P., Coppola N. Advances in the treatment of hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(10):1337–1349. DOI: 10.1517/14656566.2014.913571.
16. Богоявленский А. П., Турмагамбетова А. С., Березин В. Э. Противовирусные препараты растительного происхождения. *Фундаментальные исследования*. 2013;6–5:1141–1145.
17. Бортникова В. В., Карабаева В. В., Крепкова Л. В., Сидельникова Г. Ф., Мизина П. Г., Карабаева О. Н. Флакозид – лекарственный препарат из листьев бархата амурского, в терапии заболеваний гепатобилиарной системы. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(2):18–23.
18. Fateeva T. V., Deryabin P. G., Bortnikova V. V., Krepkova L. V., Mizina P. G. Experimental Study of Flakozid Activity in Viral Hepatitis C *In Vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(4):479–481. DOI: 10.1007/s10517-019-04554-5.
19. Вичканова С. А., Колхир В. К., Сокольская Т. А., Воскобойникова И. В., Быков В. А. Лекарственные средства из растений. М.: Адрис; 2009. 432 с.
20. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2013. С. 527–551.
21. Вичканова С. А., Багинская А. И., Шипулина Л. Д., Колхир В. К., Бортникова В. В., Городнюк Т. Н. Флакозид – эффективное растительное средство для лечения гепатитов вирусной и не вирусной этиологии, а также вирусных поражений кожи. В кн.: Сборник научных трудов ВИЛАР: химия, технология, медицина. М.: ВИЛАР; 2000. С. 316–323.
22. Дерябин П. Г., Львов Д. К. Высокопродуктивный вариант вируса гепатита С. Выделение, характеристика, идентификация. *Доклады Академии наук*. 1998;358(5):688–691.

REFERENCES

1. Fazylov V. Kh. Etiological and pathogenetic aspects of diagnosis and treatment of viral hepatitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2013;94(6):785–792. (In Russ.) DOI: 10.17816/KMJ1791.
2. Kosagovskaya I. I., Volchkova E. V. The medico-social aspects of viral hepatitis with the parenteral way of transmission. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and infectious diseases*. 2013;18(1):28–39. (In Russ.) DOI: 10.17816/EID40715.
3. Mikhaylov M. I., Yushchuk N. D., Malinnikova E. Yu., Kyuregyan K. K., Isaeva O. V., Znoyko O. O., Klimova E. A. Viral hepatitis as public health problem in the Russian Federation (a design program for the control and elimination of viral hepatitis). *ORGZDRAV: novosti, mneniya, obuchenie. Vestnik VSHOUZ = ORGZDRAV: news, views, education. Bulletin of VSHOUZ*. 2018;2(12):20–29. (In Russ.)
4. Azeem H. A., Alkabeer A. M., Mohammed A. S. Study of hepatitis B virus infection, reactivation among patients with chronic hepatitis C infection treated by direct antiviral agents (DAAs). *Egyptian Liver Journal*. 2021;11(53). DOI: 10.1186/s43066-021-00121-8.
5. Miguere M., Lhomme S., Izopet J. Hepatitis A: Epidemiology, High-Risk Groups, Prevention and Research on Antiviral Treatment. *Viruses*. 2021;13(10):1900. DOI: 10.3390/v13101900.
6. Westermann C., Wendeler D., Nienhaus A. Hepatitis C in healthcare personnel: follow-up analysis of treatments with direct-acting antiviral agents. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2021;16:34. DOI: 10.1186/s12995-021-00320-4.
7. Pintó R. M., Pérez-Rodríguez F.-J., Costafreda M.-I., Chavarria-Miró G., Guix S., Ribes E., Bosch A. Pathogenicity and virulence of hepatitis A virus. *Virulence*. 2021;12(1):1174–1185. DOI: 10.1080/21505594.2021.1910442.

8. Abutaleb A., Kotttilil S. Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2020;49(2):191–199. DOI: 10.1016/j.gtc.2020.01.002.
9. Sharapov U. M., Hu D. J. Viral hepatitis A, B, and C: grown-up issues. *Adolesc Med State Art Rev*. 2010;21(2):265–286.
10. Kanda T., Sasaki R., Masuzaki R., Takahashi H., Mizutani T., Matsumoto N., Nirei K., Moriyama M. Co-Occurrence of hepatitis A infection and chronic liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6384. DOI: 10.3390/ijms21176384.
11. Pardee M. Diagnosis and Management of Hepatitis B and C. *Nursing Clinics of North America*. 2019;54(2):277–284. DOI: 10.1016/j.cnur.2019.02.004.
12. Chuelov S. B., Rossina A. L., Uchaikin V. F. Etiotropic therapy of viral hepatitis. *Detskie infektsii = Children infections*. 2017;16(3):32–40. (In Russ.) DOI: 10.22627/2072-8107-2017-16-3-32-40.
13. Gosudarstvennyy doklad "O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2020 godu". *Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ey i blagopoluchiya cheloveka* [State report "On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2020". Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare] 2021. 256 p. Available at: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266 Accessed: 05.07.2021. (In Russ.)
14. Shulzhenko A. E. *Gerpetcheskie infektsii cheloveka. Perspektivy diagnostiki i protivovirusnoy terapii* [Herpetic infections in humans. Prospects for diagnostics and antiviral therapy]. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2005;4(3):76–81. (In Russ.)
15. Sagnelli E., Pisaturo M., Martini S., Sagnelli C., Filippini P., Coppola N. Advances in the treatment of hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(10):1337–1349. DOI: 10.1517/14656566.2014.913571.
16. Bogoyavlenskiy A. P., Turmagambetova A. S., Berezin V. E. Antiviral preparations of plant origin. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;6–5:1141–1145. (In Russ.)
17. Bortnikova V. V., Karabaeva V. V., Krepkova L. V., Sidelnikova G. F., Mizina P. G., Karabaeva O. N. Flakozid – drug from the leaves of phellodendron amurense rupestris, in treatment of diseases of the hepatobiliary system. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2020;23(2):18–23. (In Russ.)
18. Fateeva T. V., Deryabin P. G., Bortnikova V. V., Krepkova L. V., Mizina P. G. Experimental Study of Flakozid Activity in Viral Hepatitis C *In Vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(4):479–481. DOI: 10.1007/s10517-019-04554-5.
19. Vichkanova S. A., Kolkhir V. K., Sokol'skaya T. A., Voskoboinikova I. V., Bykov V. A. *Lekarstvennye sredstva iz rasteniy* [Medicinal products from plants]. Moscow: Adris; 2009. 432 p. (In Russ.)
20. *Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu spetsificheskoy protivovirusnoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv. V kn.: Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Methodical recommendations for the preclinical study of the specific antiviral activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs]. Part I. Moscow: Grif i K; 2013. P. 527–551 (In Russ.)
21. Vichkanova S. A., Baginskaya A. I., Shipulina L. D., Kolkhir V. K., Bortnikova V. V., Gorodnyuk T. I. *Flakozid – effektivnoe rastitel'noe sredstvo dlya lecheniya gepatitov virusnoy i ne virusnoy etiologii, a takzhe virusnykh porazheniy kozhi. V kn.: Sbornik nauchnykh trudov VILAR: khimiya, tekhnologiya, meditsina* [Flacoside is an effective herbal remedy for the treatment of viral and non-viral hepatitis, as well as viral skin lesions. In: Collection of scientific works VILAR: chemistry, technology, medicine]. Moscow: VILAR; 2000. P. 316–323. (In Russ.)
22. Deryabin P. G., L'vov D. K. *Vysokoproduktivnyy variant virusa gepatita S. Vydelenie, kharakteristika, identifikatsiya* [Highly productive variant of the hepatitis C virus. Isolation, characteristics, identification]. *Doklady Akademii nauk*. 1998;358(5):688–691. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189>
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

П. К. Карнакова^{1,2*}, Т. Н. Комаров^{1,3}, О. А. Арчакова¹, Д. С. Щелгачева¹, А. В. Алешина¹,
Н. С. Багаева¹, П. А. Карпова^{1,2}, И. Е. Шохин^{1,3}

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

³ ФГАУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

*Контактное лицо: Карнакова Полина К. E-mail: p.karnakova@cpha.ru

ORCID: П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;

Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; А. В. Алешина – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;

П. А. Карпова – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 11.10.2021

Статья принята в печать: 15.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Наибольшей эффективностью и безопасностью в лечении артериальной гипертензии обладают комбинированные лекарственные препараты. Комбинация кандесартана и гидрохлоротиазида (антагонист рецепторов АТ₁ и тиазидный диуретик соответственно) обеспечивает высокую эффективность антигипертензивной комбинированной терапии и находит широкое применение в медицинской практике. Разработка методики совместного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека является необходимой процедурой для выполнения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом высокоскоростной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшего исследования биоэквивалентности.

Материалы и методы. Определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом. Внутренний стандарт: смешанный раствор валсартана и индапамида. Подвижная фаза: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А), 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Колонка: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм, 5 мкм. Аналитические диапазоны методики: 2,00–300,00 нг/мл для кандесартана, 2,00–200,00 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме крови. Источник ионизации: электроспрей. Условия детектирования: 441,10 → 192,00 m/z, 441,10 → 263,15 m/z (кандесартан), 295,85 → 269,00 m/z (гидрохлоротиазид), 436,00 → 207,05 m/z (валсартан), 363,85 → 132,10 m/z, 363,85 → 189,00 m/z (индапамид).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и внутренних стандартов; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналитов; долгосрочная стабильность аналитов в матрице). Разработанная и валидированная методика соответствует требованиям правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза.

Заключение. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 2,00–300,00 нг/мл для кандесартана и 2,00–200,00 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения исследования биоэквивалентности комбинированных препаратов кандесартана и гидрохлоротиазида.

Ключевые слова: кандесартан, гидрохлоротиазид, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, определение, фармакокинетика, биоэквивалентность

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, А. В. Алешина, П. К. Карнакова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. П. А. Карпова занималась подготовкой проб к анализу. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Карпова П. А., Шохин И. Е. Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):177–189. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189>

Simultaneous Determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Polina K. Karnakova^{1,2*}, Timofey N. Komarov^{1,3}, Olga A. Archakova¹, Dana S. Shchelgacheva¹,
Alexandra A. Aleshina¹, Natalia S. Bagaeva¹, Polina A. Karpova^{1,2}, Igor E. Shohin^{1,3}

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 National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

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

© Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Карпова П. А., Шохин И. Е., 2021

© Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Karpova P. A., Shohin I. E., 2021

ORCID: Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>;
Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Shchegacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;
Alexandra A. Aleshina – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
Polina A. Karpova – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 11.10.2021

Revised: 15.11.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. Combined drugs have the greatest efficacy and safety in arterial hypertension treatment. The combination of candesartan and hydrochlorothiazide (AT₁-receptor antagonist and a thiazide diuretic, respectively) provides high efficiency of antihypertensive combination therapy, therefore it is widely used in medical practice. Developing a method for simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human blood plasma is necessary for performing the analytical part of pharmacokinetic studies and bioequivalence studies of multicomponent drugs.

Aim. The aim of this study is to develop a method for quantitative determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for further bioequivalence studies.

Materials and methods. Determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation. Internal standard: mixed solution of valsartan and indapamide. Mobile phase: 0.1 % formic acid solution in water (eluent A), 0.1 % formic acid in acetonitrile (eluent B). Column: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50x4.6 mm, 5 µm. Analytical range: 2.00–300.00 ng/mL for candesartan, 2.00–200.00 ng/mL for hydrochlorothiazide in human plasma. Ionization source: electrospray ionization. Detection conditions: 441.10 → 192.00 m/z, 441.10 → 263.15 m/z (candesartan), 295.85 → 269.00 m/z (hydrochlorothiazide), 436.00 → 207.05 m/z (valsartan), 363.85 → 132.10, 363.85 → 189.00 m/z (indapamide).

Results and discussion. This method was validated by selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability. The developed method meets the requirements for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union.

Conclusion. The analytical range was 2.00–300.00 ng/mL for candesartan, 2.00–200.00 ng/mL for hydrochlorothiazide in human plasma. The method was applied in BE study of the combination of candesartan and hydrochlorothiazide.

Keywords: candesartan, hydrochlorothiazide, plasma, blood, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchegacheva, Alexandra A. Aleshina, Polina K. Karnakova have developed and validated the analytical method. Polina A. Karpova was involved in sample preparation. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin 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: Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchegacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Karpova P. A., Shohin I. E. Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC-MS/MS. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):177–189. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189>

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день артериальная гипертензия (АГ) – наиболее часто встречаемое заболевание сердечно-сосудистой системы. По данным ВОЗ за 2000–2019 гг. сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают лидирующую позицию в списке десяти ведущих причин смертности [1]; 54 % инсультов и 47 % случаев ишемической болезни сердца являются прямым следствием артериальной гипертензии [2]. Таким образом, артериальная гипертензия считается одним из основных факторов риска возникновения таких осложнений ССЗ, как сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и инсульт, что часто приводит к инвалидности и смерти [2, 3]. В последнее время эффективная терапия артериальной гипертензии во многом помогла снизить риски возникновения инсультов [4]. Тем не менее наблюдается тенденция роста случаев возникновения артериальной гипертензии среди населения, и к 2025 году прогнозируется 1,56 млрд пациентов с данным заболеванием [5].

В руководстве ESC/ESH 2018 [European Society of Cardiology/European Society of Hypertension (Европейская ассоциация кардиологов/Европейское общество по лечению артериальной гипертензии)] кандесартан в комбинации с гидрохлоротиазидом были отнесены к препаратам первой линии для лечения артериальной гипертензии. По данным многочисленных клинических исследований можно сделать вывод о том, что снижение артериального давления (АД) при использовании данной комбинации значительно, чем при монотерапии любым из этих препаратов и по сравнению с другими антигипертензивными препаратами, относящимися к той же терапевтической группе. Кроме того, эта комбинация показала хорошую переносимость и небольшое количество побочных реакций; также прием кандесартана и гидрохлоротиазида эффективно снижает уровень АД даже после пропущенной дозы [6]. Были отмечены их нейтральный метаболический профиль, органопротективное действие и возможность использования у

пациентов с хронической болезнью почек, хронической сердечной недостаточностью, инсультом в анамнезе [7–13].

Таким образом, разработка комбинированных лекарственных препаратов кандесартана и гидрохлоротиазида является важным и перспективным направлением.

Кандесартан (2-этокси-1-({4-[2-(2H-1,2,3,4-тетразол-5-ил)фенил]фенил}метил)-1H-1,3-бензодиазол-6-карбоновая кислота) – антигипертензивное средство, оказывающее дозозависимое длительное снижение АД и общего периферического сопротивления сосудов без изменения частоты сердечных сокращений. Является непептидным блокатором рецепторов ангиотензина II (БРА), избирательно связывающимся с рецептором ангиотензина II подтипа 1 (AT₁); не обладает активностью в отношении подтипа рецептора AT₂, что характеризует его высокоселективную блокаду ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС). В результате блокирования рецепторов AT₁ происходит дозозависимое повышение активности ренина, ангиотензина I, ангиотензина II и снижение концентрации альдостерона в плазме крови. Высокая тропность к AT₁-рецепторам, медленная диссоциация из связи с ними и повторное связывание объясняют, почему этот лекарственный препарат обладает более выраженным и длительным антигипертензивным действием, чем другие блокаторы рецепторов ангиотензина, и обеспечивает сохранение антигипертензивного эффекта даже при пропущенном приеме очередной дозы. Кандесартан хорошо переносится пациентами с гипертонией. Нежелательные явления не связаны с дозой и в основном имеют легкую или умеренную степень тяжести [14, 15].

Гидрохлоротиазид (6-хлор-3,4-дигидро-2H-1,2,4-бензотиадиазин-7-сульфонамид-1,1-диоксид) – это тиазидный диуретик. Действует на дистальные каналы почек и снижает реабсорбцию ионов натрия и хлора, а также угнетает чувствительность стенок сосудов к сосудосуживающему влиянию различных медиаторов. Вследствие этого, а также за счет снижения объема циркулирующей крови препарат оказывает диуретическое действие и нормализует кровяное давление [16, 17]. Несмотря на то, что гидрохлоротиазид остается препаратом выбора при АГ, его эффективное применение в качестве монотерапии может быть ограничено различными факторами, в основном связанными с межиндивидуальной вариабельностью [14]. Применение гидрохлоротиазида вместе с препаратами из группы БРА за счет аддитивного влияния на патогенетические механизмы АГ обеспечивает высокую эффективность комбинированной терапии [18, 19].

Разработка и валидация методики совместного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности многокомпонентных лекарственных средств [20].

В настоящее время опубликован ряд исследований по определению кандесартана и гидрохлоротиазида в биологических жидкостях с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения данных веществ применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV)], флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) [high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)].

В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки используется способ жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), а в некоторых случаях способ осаждения белков метанолом (MeOH) или ацетонитрилом (ACN), твердофазная экстракция (ТФЭ) (таблица 1).

Проанализировав литературные данные по разработке методик определения кандесартана и гидрохлоротиазида, было сделано заключение об отсутствии опубликованных методик совместного определения данных веществ одновременно с достаточной чувствительностью и простым способом пробоподготовки, поэтому было принято решение разработать и валидировать такую методику самостоятельно.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков ацетонитрилом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащенный градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройным квадруполом) (Shimadzu Corporation, Япония). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды); ацетонитрил (класс «Ultra Gradient HPLC-grade», J.T. Baker, Ни-

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения кандесартана и гидрохлоротиазида

Table 1. Bioanalytical methods of candesartan and hydrochlorothiazide quantitative determination

Аналитический метод (источник ионизации; ионизация (+/-), если применимо) Analytical method (ionization source; ionization (+/-) if applicable)	Объект анализа Object	Пробоподготовка Sample preparation	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/mL		Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; -) HPLC-MS/MS (electrospray; -)	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	1,027–302,047	[21]
			ГХТ HCTZ	1,044–306,945	
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; -) UPLC-MS/MS (electrospray; -)	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	1,00–499,15	[22]
			ГХТ HCTZ	1,00–499,15	
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение АСН Protein precipitation by acetonitrile	КАН CAN	30,00–2500,00	[23]
			ГХТ HCTZ	20,00–100,00	
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; -) HPLC-MS/MS (electrospray; -)	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	1,00–160,00	[24]
			ГХТ HCTZ	2,00–160,00	
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение АСН Protein precipitation by acetonitrile	КАН CAN	3,125–200,000	[25]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	КАН CAN	20,00–200,00	[26]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; +) PLC-MS/MS (electrospray; +)	Плазма крови человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	КАН CAN	1,00–400,00	[27]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	ГХТ HCTZ	10,00–900,00	[28]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; -) HPLC-MS/MS (electrospray; -)	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение MeOH Protein precipitation by methanol	ГХТ HCTZ	0,78–200,00	[29]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; -) HPLC-MS/MS (electrospray; -)	Моча и плазма крови человека Human plasma and urine	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	ГХТ HCTZ	Плазма: 1,00–100,00 Моча: 0,05–20,00 Plasma: 1.00–100.00 Urine: 0.05–20.00	[30]

дерланды; ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «ТД «ХИМ-МЕД», Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReas, Испания); вода очищенная Milli-Q.

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы стандартные образцы кандесартана (USP reference standard, Китай, содержание 100,0 %), гидрохлоротиазида (Unichem Laboratories Limited, Индия, содержание 99,6 %), валсартана (USP reference standard, Швейцария, содержание 99,8 %) и индапамида (USP reference standard, Испания, содержание 99,7 %).

Исходные стандартные растворы кандесартана, гидрохлоротиазида и внутренних стандартов (ВС) валсартана и индапамида готовили путем растворения навески субстанции в ацетонитриле.

Смешанные рабочие стандартные растворы кандесартана, гидрохлоротиазида и смешанный рабочий раствор ВС готовили путем разведения исходных стандартных растворов тем же растворителем до получения в биологической матрице концентраций, соответствующих уровням 1–8, нижнему пределу ко-

личественного определения (НПКО) [Lower limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], средним [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2).

Образцы интактной плазмы, исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 200 мкл образца (калибровочного образца, образца контроля качества и образца интактной плазмы крови), помещенным в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл смешанного рабочего раствора ВС, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин с ускорением 15 000 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 2. Concentrations of analytes at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml		Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml	
	КАН CAN	ГХТ HCTZ	ВАЛ VAL	ИНД IND
1	2,00	2,00	100,00	100,00
2	15,00	15,00	100,00	100,00
3	50,00	25,00	100,00	100,00
4	100,00	50,00	100,00	100,00
5	150,00	75,00	100,00	100,00
6	200,00	100,00	100,00	100,00
7	250,00	150,00	100,00	100,00
8	300,00	200,00	100,00	100,00
LLOQ	2,00	2,00	100,00	100,00
L	6,00	6,00	100,00	100,00
M1	90,00	60,00	100,00	100,00
M2	180,00	120,00	100,00	100,00

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 50 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges C18 4 × 3,0 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (по объёму); элюент В: 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- Скорость потока подвижной фазы (ПФ) – 1,0 мл/мин.
- Градиент по составу ПФ представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %
0,00	90,00	10,00
1,00	90,00	10,00
3,50	0,00	100,00
4,50	0,00	100,00
4,70	90,00	10,00
6,50	90,00	10,00

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–6,50 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 200 °С.
- Напряжение на капилляре, режим ионизации и условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Параметры источника ионизации и условия детектирования

Table 4. Ion-source parameters and detection conditions

	Напряжение на капилляре Capillary voltage	Режим ионизации Ion mode	Условия детектирования Detection conditions
КАН CAN	3,0	+	441,10 → 192,00 m/z, 441,10 → 263,15 m/z
ГХТ HCTZ	4,5	–	295,85 → 269,00 m/z
ВАЛ VAL	3,0	+	436,00 → 207,05 m/z
ИНД IND	5,0	–	363,85 → 132,10, 363,85 → 189,00 m/z

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В качестве внутренних стандартов (ВС) были подобраны вещества, похожие на анализируемые вещества по структуре и физико-химическим свойствам (таблица 5). ВС для кандесартана был выбран валсартан ((S)-N-(1-карбокси-2-метилпроп-1-ил)-N-пента-ноил-N-[2-(1H-тетразол-5-ил)бифенил-4-ил-метил]амин), для гидрохлоротиазида – индапамид (3-(аминосulфонил)-4-хлор-N-(2,3-дигидро-2-метил-1H-индол-1-ил)бензамид).

Таблица 5. Физико-химические свойства анализируемых веществ и внутренних стандартов

Table 5. Physicochemical properties of the analytes and internal standards

	Молекулярная масса, г/моль Molecular mass, g/mol	pKa	logP	Ссылка Reference
КАН CAN	440,5	4,23	6,12	[31]
ВАЛ VAL	435,5	4,37	5,27	[32]
ГХТ HCTZ	297,7	9,09	–0,58	[33]
ИНД IND	365,8	8,85	2,64	[34]

Использовались условия масс-спектрометрического детектирования, позволяющие получить пики аналитов и ВС с наибольшей интенсивностью. Во время разработки методики были проанализированы фрагменты, получаемые при разных энергиях соударения.

Было отмечено, что гидрохлоротиазид и индапамид в режиме отрицательной ионизации образуют аддукты с остатками трифторуксусной кислоты (ТФУ). Учитывая это, для анализа требовалось создавать избыток ТФУ в системе, что негативно влияло на ионизацию кандесартана и валсартана, поэтому были подобраны оптимальные значения напряжений на линии десольватации, обеспечивающие разрушение образующихся аддуктов, что позволяло проводить анализ по исходным молекулярным ионам.

В качестве осадителя был выбран ацетонитрил, так как его использование обеспечивало наиболее полное осаждение белков плазмы крови и оптимальную форму хроматографических пиков.

В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств определяемых веществ, были рассмотрены несколько колонок для хроматографического разделения данной комбинации веществ, в том числе: Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18, 2,7 мкм, 3,0 × 100 мм; Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl, 2,7 мкм, 2,1 × 50 мм; Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 5 мкм, 50 × 4,6 мм. После сравнения хроматографических характеристик данных колонок (таблица 6) в качестве окончательного варианта была выбрана колонка Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl.

Таблица 6. Хроматографические характеристики

Table 6. Characteristics of chromatography

Характеристика Characteristic	Вещество Substance	Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18	Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl
Приведенное время удерживания Relative retention time	ГХТ HCTZ	0,082	1,196	1,585
	ИНД IND	2,054	—*	2,181
	ВАЛ VAL	2,365	—*	2,326
	КАН CAN	2,939	2,731	2,800
Фактор асимметрии Tailing factor	ГХТ HCTZ	1,191	0,725	1,239
	ИНД IND	1,344	—*	1,148
	ВАЛ VAL	1,320	—*	1,509
	КАН CAN	1,015	1,218	1,076
Ширина Width	ГХТ HCTZ	0,288	0,528	0,137
	ИНД IND	0,142	—*	0,108
	ВАЛ VAL	0,149	—*	0,096
	КАН CAN	0,193	0,087	0,142

Примечание. * Подбор условий хроматографического разделения валсартана и индапамида с использованием колонки Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl не производился, поскольку были получены неудовлетворительные характеристики хроматографического разделения кандесартана и гидрохлоротиазида.

Note. * We did not adjust the conditions for chromatographic separations of valsartan and indapamide using the Shimadzu Shim-pack Velox Biphenyl column was not performed because the chromatographic separation of candasartan and hydrochlorothiazide was not satisfactory.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики совместного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека проводили на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [20], а также руководств FDA [35] и EMA [36] по следующим параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность (на уровнях внутри цикла, между циклов), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов), степень извлечения, нижний предел количественного определения и предел обнаружения, перенос пробы, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и ВС; краткосрочная стабильность («насто́льная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналитов; долгосрочная стабильность аналитов в матрице].

Селективность

Для оценки данного параметра проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови: 2 образцов интактной плазмы с повышенным содержанием липидов и 2 образцов гемолизной интактной плазмы, полученных из разных источников, а также образцов с прибавлением смешанных рабочих стандартных растворов до концентраций анализируемых веществ и ВС, соответствующих уровню 1 (см. таблицу 2).

На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемых веществ и ВС или их сигнал не превышает 20 % от сигнала на уровне НПКО и 5 % от сигнала ВС соответственно. Хроматограмма образца интактной плазмы крови приведена на рисунке 1.

Эффект матрицы

Для оценки влияния биологической матрицы на количественное определение кандесартана в комбинации с гидрохлоротиазидом были проанализированы образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов кандесартана и гидрохлоротиазида и смешанного рабочего раствора ВС без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени извлечения анализируемых веществ и ВС из биологической матрицы.

Эффект матрицы был оценен на уровнях L и H аналитических диапазонов концентраций кандесартана и гидрохлоротиазида (см. таблицу 2). Для ВС валсартана и индапамида эффект матрицы был рассчитан на уровне 100,00 нг/мл. Данные представлены в таблице 7.

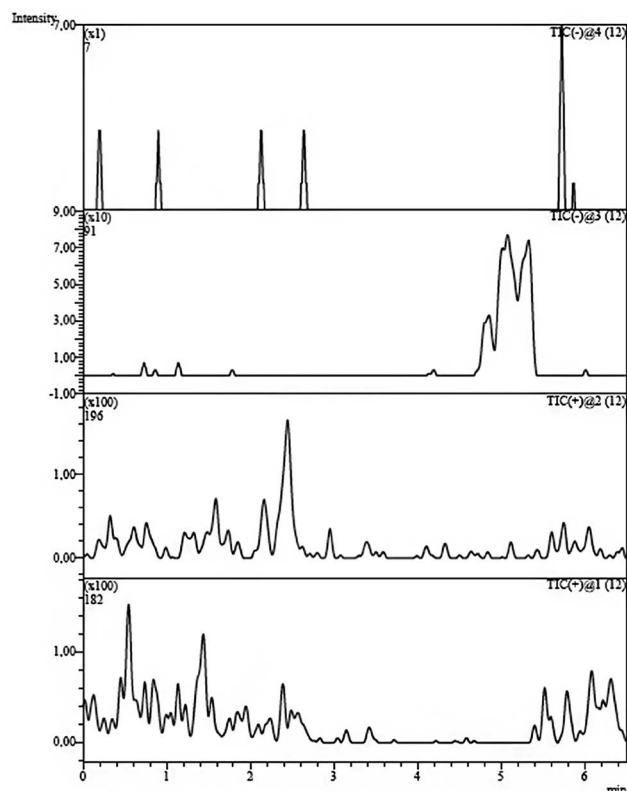


Рисунок 1. Хроматограмма образца интактной плазмы крови
Figure 1. Blank plasma sample chromatogram

Таблица 7. Расчет фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта

Table 7. Calculation of the matrix factor of the analyzed substances, normalized by the matrix factor of internal standards

	Плазма крови Blank plasma	Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	Гиперлипидемическая плазма Lipemic blank plasma	Нормализованный Mf Normalized Mf					
				L	H	L	H	L	H
				Кандесартан Candesartan					
Среднее Average	1,00	0,90	1,00	0,90	0,97	0,91			
CV, %	7,28	2,84	6,20	5,42	7,45	2,89			
Гидрохлоротиазид Hydrochlorothiazide									
Среднее Average	0,79	0,83	0,65	0,76	0,73	0,89			
CV, %	14,22	8,43	14,28	6,64	12,96	4,49			

По полученным данным был рассчитан фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту. Коэффициент вариации (CV, %) фактора матрицы,

нормализованного по внутреннему стандарту, не превышает 15 % и соответствует требованиям нормативной документации.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с прибавлением смешанного рабочего раствора ВС и смешанных рабочих стандартных растворов кандесартана и гидрохлоротиазида до получения концентраций анализируемых веществ и внутренних стандартов, соответствующих уровням 1–8 (см. таблицу 2).

По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика кандесартана к площади пика валсартана от отношения концентрации кандесартана к концентрации валсартана в плазме крови, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика гидрохлоротиазида к площади пика индапамида от отношения концентрации гидрохлоротиазида к концентрации индапамида в плазме крови.

Уравнения калибровочных графиков имели следующий вид: $f(x) = a \times x + b$. Значения переменных и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–3 приведены в таблице 8. Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам. Примеры хроматограмм приведены на рисунках 2, 3.

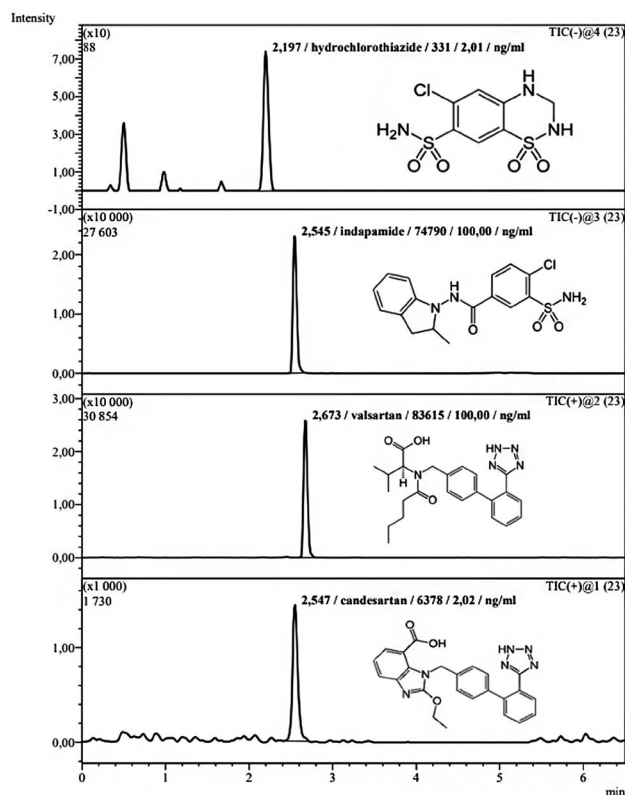


Рисунок 2. Хроматограмма образца плазмы крови (КАН 2,00 нг/мл, ГХТ 2,00 нг/мл)

Figure 2. Chromatogram of plasma sample (CAN 2.00 ng/ml, HCTZ 2.00 ng/ml)

Таблица 8. Значения переменных и коэффициенты корреляции

Table 8. Variable values and correlation coefficients

№	a	b	R	a	b	R
	КАН CAN			ГХТ HCTZ		
1	3,45720	0,00629339	0,9973444	0,345995	0,00251571	0,9963785
2	3,02578	0,01029410	0,9983502	0,400132	0,00227891	0,9955384
3	2,94655	0,00336622	0,9977839	0,390876	0,00096891	0,9969791

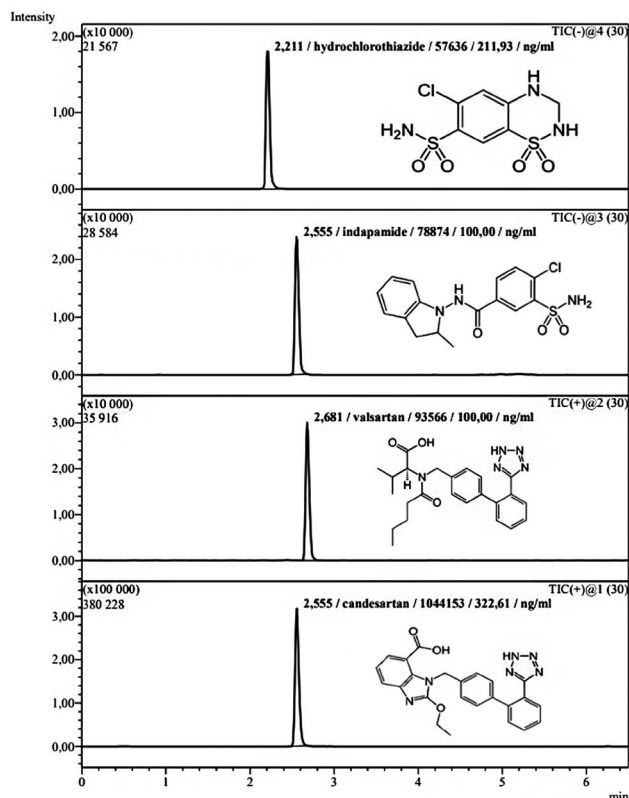


Рисунок 3. Хроматограмма образца плазмы крови (КАН 300,00 нг/мл, ГХТ 200,00 нг/мл)

Figure 3. Chromatogram of blood sample (CAN 300.00 ng/ml, HCTZ 200.00 ng/ml)

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 2). Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 вводов образца для каждого уровня концентраций кандесартана и гидрохлоротиазида.

Оценка параметра оценивалась внутри цикла, между двумя и между тремя циклами. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Данные соответствуют нормам (таблица 9).

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы, гемолизной плазмы, гиперлипидемической

плазмы без влияния степени извлечения на низком (уровень L), средних (уровень M1, уровень M2) и высоком (уровень H) уровнях, а также образцы контроля качества, приготовленные на различных интактных матрицах, для оценки степени извлечения. Данные представлены в таблице 10. RSD рассчитанных значений степени извлечения аналитов из биологических матриц не превышает 15 %.

Таблица 9. Точность и прецизионность методики определения кандесартана и гидрохлоротиазида (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Table 9. Accuracy and precision of candesartan and hydrochlorothiazide determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
Кандесартан Candesartan						
2,00	7,68	7,99	8,47	-9,60	-10,80	-9,13
6,00	4,39	4,81	4,86	-5,80	-8,77	-9,10
90,00	3,27	4,80	4,24	4,40	7,91	8,87
180,00	3,88	3,69	3,01	6,86	7,63	7,62
240,00	3,30	3,69	3,70	7,27	8,09	9,14
Гидрохлоротиазид Hydrochlorothiazide						
2,00	4,55	14,14	12,91	10,10	-2,35	0,50
6,00	7,31	10,16	9,68	2,83	-0,27	2,96
60,00	3,09	4,52	4,75	7,80	6,02	8,14
120,00	1,87	5,17	5,19	5,76	2,16	3,34
160,00	6,03	4,33	5,20	1,50	1,65	4,13

Нижний предел

количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. За НПКО методики принимались минимальные концентрации кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови в соответствующих аналитических диапазонах, для которых возможно количественное определение кандесартана и гидрохлоротиазида со значениями RSD и E не более 20 %. Нижние пределы количественного определения методики составили 2,00 нг/мл для кандесартана и 2,00 нг/мл для гидрохлоротиазида.

Хроматограмма плазмы крови с содержанием кандесартана и гидрохлоротиазида на уровне НПКО приведена на рисунке 2.

Таблица 10. Оценка степени извлечения кандесартана и гидрохлоротиазида на уровнях L, M1, M2 и H из различных биологических матриц

Table 10. Calculation of candesartan and hydrochlorothiazide recovery at L, M1, M2, H levels from the different biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	СИ КАН. % Recovery CAN, %				СИ ГХТ. % Recovery HCTZ, %			
	L	M1	M2	H	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	111,62	106,60	97,73	103,62	100,60	104,56	106,05	101,83
	107,76	95,28	93,15	106,80	107,94	110,22	95,88	119,57
	112,48	93,90	102,06	103,06	98,08	100,30	100,35	105,52
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	88,89	80,14	93,58	93,52	88,64	81,55	100,91	88,70
	94,92	78,61	96,16	88,33	67,33	90,44	100,36	104,61
	94,87	80,57	94,86	86,46	71,96	91,53	106,72	101,79
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	87,09	89,20	93,06	84,74	98,17	106,17	95,95	100,64
	93,76	92,47	96,28	89,90	61,64	98,23	104,37	95,28
	95,87	92,14	91,80	88,82	85,58	97,49	97,17	91,68
Среднее Average	94,45				96,61			
SD	8,22				11,71			
RSD	8,70				12,12			

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («насто́льная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 60 дней при температуре -45°C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре -45°C) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций (см. таблицу 2). Данные приведены в таблице 11. Для полученных значений концентраций анализируемых веществ была рассчитана от-

носительная погрешность E, %. Полученные величины относительной погрешности соответствуют нормам.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов с наибольшей концентрацией и образцов интактной плазмы крови на хроматограммах образцов интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и ВС.

Таблица 11. Оценка стабильности

Table 11. Stability assessment

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Среднее значение E, % Average value of E, %			
		КАН CAN		ГХТ HCTZ	
		L	H	L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ Analyzed freshly prepared; stored at $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$	-11,44	-14,74	11,89	7,24
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	29 часов при температуре 4°C 29 hours at 4°C	-11,44	13,75	-10,56	5,56
Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	42 часа при температуре $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$ и 9 часов при температуре $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 42 hours at $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$ and 9 hours at $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$	-11,33	10,28	11,17	9,16
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	80 дней при температуре $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$ 80 days at $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$	13,75	13,75	11,17	10,98
Стабильность исходных стандартных растворов Stock solution stability	80 дней при температуре $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$ 80 days at $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$	-11,22	-8,58	11,78	8,32
Стабильность рабочих стандартных растворов Work solution stability	80 дней при температуре $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$ 80 days at $-42,5 \pm 7,5^{\circ}\text{C}$	-7,94	11,40	0,00	7,00

Применение разработанной методики

Был проведен аналитический этап исследования биоэквивалентности воспроизведенного комбинированного препарата кандесартана – гидрохлоротиазида и препарата сравнения. На рисунке 4 приведен пример хроматограммы образца плазмы крови добровольца, принимавшего участие в данном исследовании.

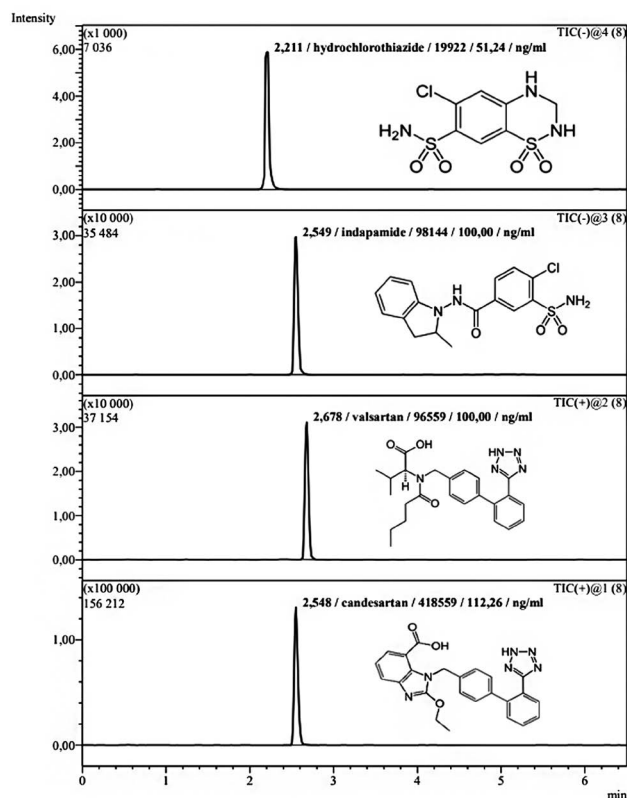


Рисунок 4. Хроматограмма плазмы крови добровольца
Figure 4. Chromatogram of volunteer plasma sample

Индивидуальные профили изменения значений концентраций кандесартана (гидрохлоротиазида) в плазме крови человека во времени (t), зарегистрированные после приема исследуемого препарата и препарата сравнения, характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t , выше нПКО (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций, площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$).

В таблице 12 приведены значения среднего арифметического и среднего геометрического для кандесартана и гидрохлоротиазида.

Фармакокинетические профили исследуемого препарата и препарата сравнения приведены на рисунках 5, 6.

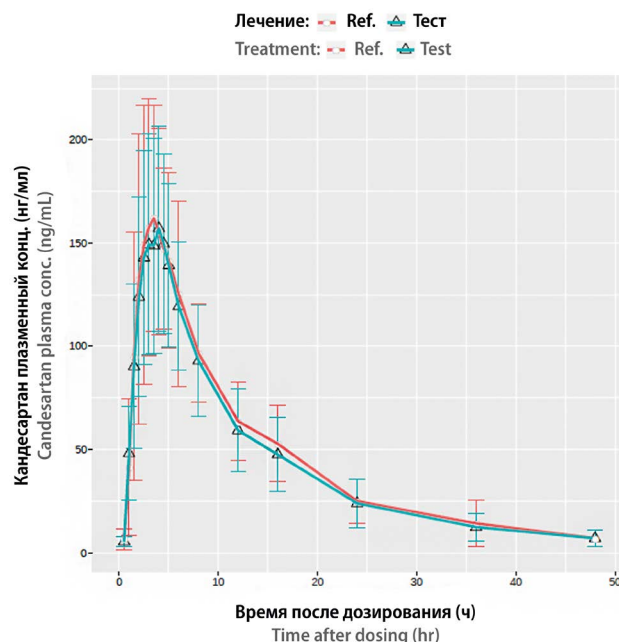


Рисунок 5. Усредненные фармакокинетические профили кандесартана (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями). Исследуемый препарат (Т), препарат сравнения (R)

Figure 5. Average pharmacokinetic profiles of candesartan (in linear transformation with standard deviations). Test drug product (T), Reference drug product (R)

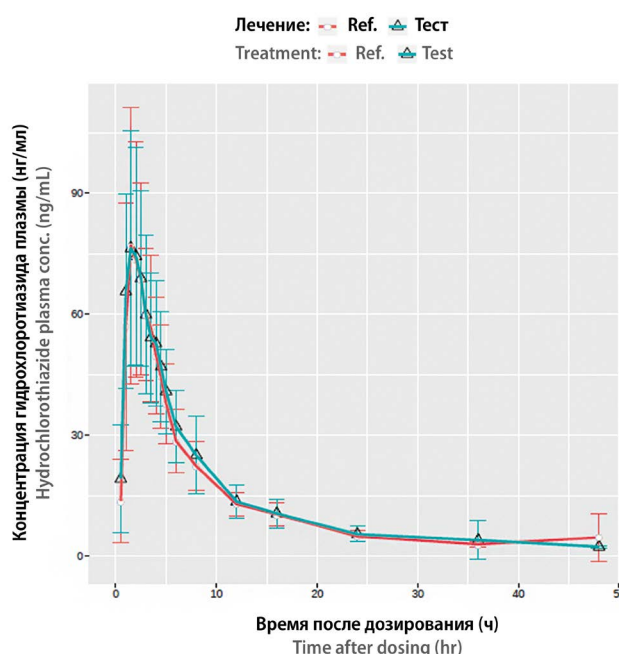


Рисунок 6. Усредненные фармакокинетические профили гидрохлоротиазида (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями). Исследуемый препарат (Т), препарат сравнения (R)

Figure 6. Averaged pharmacokinetic profiles of hydrochlorothiazide (in linear transformation, with standard deviations). Test drug product (T), Reference drug product (R)

Таблица 12. Значения средних арифметических и средних геометрических параметров для кандесартана и гидрохлоротиазида
Table 12. Arithmetic means and geometric means values of candesartan and hydrochlorothiazide

Параметры Parameters	Mean (GMean)			
	КАН CAN		ГХТ HCTZ	
	Т	Р	Т	Р
C_{max} , нг/мл	174,15 (164,97)	185,16 (174,88)	85,29 (81,36)	83,64 (77,97)
AUC_{0-4} , нг · ч/мл	1983,31 (1891,48)	2098,79 (2033,68)	597,85 (577,39)	561,33 (544,42)
$AUC_{0-\infty}$, нг · ч/мл	2094,31 (1992,83)	2211,58 (2134,72)	645,39 (622,97)	606,44 (590,35)

Примечание. Mean – среднее арифметическое; GMean – среднее геометрическое. Исследуемый препарат (Т), препарат сравнения (Р).

Note. Mean – arithmetic mean; GMean – geometric mean. Study drug (Т), comparison drug (Р).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 2,00–300,00 нг/мл для кандесартана и 2,00–200,00 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения исследования биоэквивалентности комбинированных препаратов кандесартана и гидрохлоротиазида.

ЛИТЕРАТУРА

- ВОЗ публикует статистику о ведущих причинах смертности и инвалидности во всем мире за период 2000–2019 гг. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>. Ссылка активна на 18.10.2021.
- Jordan J., Kurschat C., Reuter H. Arterial hypertension—diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2018;115:557–568. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0557.
- Marushchak A., Rogovyy Y., Doroshko V., Shvets V., Savchuk T. Morphological changes in tissues of organs in rats with arterial hypertension (SHR) with treatment of hypotensive medicines (with ramipril and candesartan) in combination with corvutin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2020;1(23):39–44. DOI: 10.15587/2519-4852.2020.197300.
- Vangen-Lonne A. M., Wilsgaard T., Johnsen S. H., Lochen M. L., Njolstad I., Mathiesen E. B. Declining incidence of ischemic stroke: what is the impact of changing risk factors? The Tromso Study 1995 to 2012. *Stroke*. 2017;48:544–550. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.014377.
- Gierthmuehlen M., Plachta D. T., Zentner J. Implant-mediated therapy of arterial hypertension. *Current hypertension reports*. 2020;22(2):1–9. DOI: 10.1007/s11906-020-1019-7.
- Саютина Е. В. Фиксированные комбинации в современных алгоритмах лечения артериальной гипертензии. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018;17(6):86–94. DOI: 10.15829/1728-8800-2018-6-86-94.
- Mugellini A., Nieswandt V. Candesartan plus hydrochlorothiazide: an overview of its use and efficacy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012;13(18):2699–709. DOI: 10.1517/14656566.2012.745511.
- Melian E. B., Jarvis B. Candesartan cilexetil plus hydrochlorothiazide combination. *Drugs*. 2002;62(5):787–816. DOI: 10.2165/00003495-200262050-00006.
- Bönnner G., Fuchs W. Fixed combination of candesartan with hydrochlorothiazide in patients with severe primary hypertension. *Current medical research and opinion*. 2004;20(5):597–602. DOI: 10.1185/030079904125003395.
- Hosaka M., Metoki H., Satoh M., Ohkubo T., Asayama K., Kikuya M., Inoue R., Obara T., Hirose T., Imai Y. Randomized trial comparing the velocities of the antihypertensive effects on home blood pressure of candesartan and candesartan with hydrochlorothiazide. *Hypertension Research*. 2015;38(10):701–707. DOI: 10.1038/hr.2015.64.
- Mancia G., Omboni S. Candesartan plus hydrochlorothiazide fixed combination vs previous monotherapy plus diuretic in poorly controlled essential hypertensive patients. *Blood Pressure*. 2004;13(2):11–7. DOI: 10.1080/08038020410035574.
- Shina S. K. Monotherapy versus combination therapy for the initial treatment of hypertension. *Journal of Clinical and Preventive Cardiology*. 2020;9(2):78–83. DOI: 10.4103/JCPC.JCPC_27_20.
- Koenig W. Comparison of the efficacy and tolerability of combination tablets containing candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide or losartan and hydrochlorothiazide in patients with moderate to severe hypertension. *Clinical Drug Investigation*. 2000;19(4):239–246. DOI: 10.2165/00044011-200019040-00001.
- Zhao X., Wang X. Candesartan targeting of angiotensin II type 1 receptor demonstrates benefits for hypertension in pregnancy via the NF- κ B signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):705–714. DOI: 10.3892/mmr.2018.9070.
- McClellan K. J., Goa K. L. Candesartan Cilexetil. *Drugs* 1998;56:847–869. DOI: 10.2165/00003495-199856050-00013.
- Hripcsak G., Suchard M. A., Shea S., Chen R., You S. C., Pratt N., Madigan D., Krumholz H. M., Ryan P. B., Schuemie M. J. Comparison of cardiovascular and safety outcomes of chlorthalidone vs hydrochlorothiazide to treat hypertension. *JAMA internal medicine*. 2020;180(4):542–551. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.7454.
- Dineva S., Uzunova K., Pavlova V., Filipova E., Kalinov K., Vekov T. Comparative efficacy and safety of chlorthalidone and hydrochlorothiazide—meta-analysis. *Journal of human hypertension*. 2019;33:766–774. DOI: 10.1038/s41371-019-0255-2.
- Rosolová H. Combined therapy of arterial hypertension. *Vnitřní lékařství*. 2013;59(5):366–369.
- Ruzicka M., Leenen F. H. Monotherapy versus combination therapy as first line treatment of uncomplicated arterial hypertension. *Drugs*. 2001;61(7):943–954. DOI: 10.2165/00003495-200161070-00004.
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 18.10.2021.
- Bonthu M. G., Atmakuri L. R., Jangala V. R. Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC-MS/MS. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54(1). DOI: 10.1590/s2175-97902018000117381.
- Singh B., Lokhandae R. S., Dwivedi A., Sharma S., Dubey N. Improved simultaneous quantitation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by UPLC-MS/MS and its application in bioequivalence studies. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014;4(2):144–152. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.05.003.

23. Erk N. Simultaneous analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in human plasma and dosage forms using HPLC with a photodiode array detector. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2003;26(15):2581–2591. DOI: 10.1081/JLC-120023802.
24. Bharathi D. V., Hotha K. K., Chatki P. K., Satyanarayana V., Venkateswarlu V. LC-MS/MS method for simultaneous estimation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and its use in clinical pharmacokinetics. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1195–1204. DOI: 10.4155/bio.12.83.
25. Hamid S., Beg A. E., Muhammad I. N., Hassan S., Hassan A., Akram A., Alladin N. Development and validation of HPLC method for the determination of Candesartan in human plasma. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2018;31(6):2323–2327.
26. Nawaz H. A., Masood M. I., Abbas M., Usman M., Khan A. M., Rasheed H., Riffat S. Evaluation of gender difference in pharmacokinetics of Candesartan cilexetil in the fasted state by RP-HPLC: A single dose comparative study. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2019;32(3).
27. Forjan V., Maričić L. C., Prosen H., Vončina D. B. Determination of Candesartan in Human Plasma using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*. 2016;63(1):38–46. DOI: 10.17344/acsi.2015.1836.
28. Zendelovska D., Stafilov T., Miloševski P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(2):71–76. DOI: 10.1002/bmc.293.
29. Liu F., Zhang J., Xu Y., Gao S., Guo Q. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;44(5):1187–1191. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.04.020.
30. Fang W., Xie W., Hsieh J. K., Matuszewski B. K. Development and application of HPLC methods with tandem mass spectrometric detection for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine using 96-well liquid-liquid extraction. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2005;28(17):2681–2703. DOI: 10.1080/10826070500224666.
31. Candesartan. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00796>. Accessed: 18.10.2021.
32. Valsartan. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00177>. Accessed: 18.10.2021.
33. Hydrochloride. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00999>. Accessed: 18.10.2021.
34. Indapamide. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00808>. Accessed: 18.10.2021.
35. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 18.10.2021.
36. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 18.10.2021.
- ScienceRise: *Pharmaceutical Science*. 2020;1(23):39–44. DOI: 10.15587/2519-4852.2020.197300.
4. Vangen-Lonne A. M., Wilsgaard T., Johnsen S. H., Lochen M. L., Njolstad I., Mathiesen E. B. Declining incidence of ischemic stroke: what is the impact of changing risk factors? The Tromsø Study 1995 to 2012. *Stroke*. 2017;48:544–550. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.014377.
5. Gierthmuehlen M., Plachta D. T., Zentner J. Implant-mediated therapy of arterial hypertension. *Current hypertension reports*. 2020;22(2):1–9. DOI: 10.1007/s11906-020-1019-7.
6. Sayutina E. V. Fixed combinations in modern hypertension treatment algorithms. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2018;17(6):86–94. (In Russ.) DOI: 10.15829/1728-8800-2018-6-86-94.
7. Mugellini A., Nieswandt V. Candesartan plus hydrochlorothiazide: an overview of its use and efficacy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012;13(18):2699–709. DOI: 10.1517/14656566.2012.745511.
8. Melian E. B., Jarvis B. Candesartan cilexetil plus hydrochlorothiazide combination. *Drugs*. 2002;62(5):787–816. DOI: 10.2165/00003495-200262050-00006.
9. Bönner G., Fuchs W. Fixed combination of candesartan with hydrochlorothiazide in patients with severe primary hypertension. *Current medical research and opinion*. 2004;20(5):597–602. DOI: 10.1185/030079904125003395.
10. Hosaka M., Metoki H., Satoh M., Ohkubo T., Asayama K., Kikuya M., Inoue R., Obara T., Hirose T., Imai Y. Randomized trial comparing the velocities of the antihypertensive effects on home blood pressure of candesartan and candesartan with hydrochlorothiazide. *Hypertension Research*. 2015;38(10):701–707. DOI: 10.1038/hr.2015.64
11. Mancia G., Omboni S. Candesartan plus hydrochlorothiazide fixed combination vs previous monotherapy plus diuretic in poorly controlled essential hypertensive patients. *Blood Pressure*. 2004;13(2):11–7. DOI: 10.1080/080380204100035574.
12. Shina S. K. Monotherapy versus combination therapy for the initial treatment of hypertension. *Journal of Clinical and Preventive Cardiology*. 2020;9(2):78–83. DOI: 10.4103/JCPC.JCPC_27_20.
13. Koenig W. Comparison of the efficacy and tolerability of combination tablets containing candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide or losartan and hydrochlorothiazide in patients with moderate to severe hypertension. *Clinical Drug Investigation*. 2000;19(4):239–246. DOI: 10.2165/00044011-200019040-00001.
14. Zhao X., Wang X. Candesartan targeting of angiotensin II type 1 receptor demonstrates benefits for hypertension in pregnancy via the NF-κB signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):705–714. DOI: 10.3892/mmr.2018.9070.
15. McClellan K. J., Goa K. L. Candesartan Cilexetil. *Drugs* 1998;56:847–869. DOI: 10.2165/00003495-199856050-00013.
16. Hripcsak G., Suchard M. A., Shea S., Chen R., You S. C., Pratt N., Madigan D., Krumholz H. M., Ryan P. B., Schuemie M. J. Comparison of cardiovascular and safety outcomes of chlorthalidone vs hydrochlorothiazide to treat hypertension. *JAMA internal medicine*. 2020;180(4):542–551. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.7454.
17. Dineva S., Uzunova K., Pavlova V., Filipova E., Kalinov K., Vekov T. Comparative efficacy and safety of chlorthalidone and hydrochlorothiazide—meta-analysis. *Journal of human hypertension*. 2019;33:766–774. DOI: 10.1038/s41371-019-0255-2.
18. Rosolová H. Combined therapy of arterial hypertension. *Vnitřní lékařství*. 2013;59(5):366–369.
19. Ruzicka M., Leenen F. H. Monotherapy versus combination therapy as first line treatment of uncomplicated arterial hypertension. *Drugs*. 2001;61(7):943–954. DOI: 10.2165/00003495-200161070-00004.
20. Reshenie Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 3 noyabrya 2016 goda № 85 "Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza" [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 85 "On

REFERENCES

1. VOZ publikuet statistiku o vedushchikh prichinakh smernosti i invalidnosti vo vsem mire za period 2000–2019 gg. [Who reveals leading causes of death and disability worldwide 2000–2019]. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>. Accessed: 18.10.2021. (In Russ.)
2. Jordan J., Kurschat C., Reuter H. Arterial hypertension—diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2018;115:557–568. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0557.
3. Marushchak A., Rogovyy Y., Doroshko V., Shvets V., Savchuk T. Morphological changes in tissues of organs in rats with arterial hypertension (SHR) with treatment of hypotensive medicines (with ramipril and candesartan) in combination with corvutin.

- approval of the Rules for conducting studies of bioequivalence of drugs within the framework of the Eurasian Economic Union"]. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Accessed: 18.10.2021. (In Russ.)
21. Bonthu M. G., Atmakuri L. R., Jangala V. R. Simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC-MS/MS. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54(1). DOI: 10.1590/s2175-97902018000117381.
22. Singh B., Lokhandae R. S., Dwivedi A., Sharma S., Dubey N. Improved simultaneous quantitation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by UPLC-MS/MS and its application in bioequivalence studies. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014;4(2):144–152. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.05.003.
23. Erk N. Simultaneous analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in human plasma and dosage forms using HPLC with a photodiode array detector. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2003;26(15):2581–2591. DOI: 10.1081/JLC-120023802.
24. Bharathi D. V., Hotha K. K., Chatki P. K., Satyanarayana V., Venkateswarlu V. LC-MS/MS method for simultaneous estimation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and its use in clinical pharmacokinetics. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1195–1204. DOI: 10.4155/bio.12.83.
25. Hamid S., Beg A. E., Muhammad I. N., Hassan S., Hassan A., Akram A., Alladin N. Development and validation of HPLC method for the determination of Candesartan in human plasma. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2018;31(6):2323–2327.
26. Nawaz H. A., Masood M. I., Abbas M., Usman M., Khan A. M., Rashed H., Riffat S. Evaluation of gender difference in pharmacokinetics of Candesartan cilexetil in the fasted state by RP-HPLC: A single dose comparative study. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2019;32(3).
27. Forjan V., Maričić L. C., Prosen H., Vončina D. B. Determination of Candesartan in Human Plasma using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*. 2016;63(1):38–46. DOI: 10.17344/acsi.2015.1836.
28. Zendelovska D., Stafilov T., Miloševski P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(2):71–76. DOI: 10.1002/bmc.293.
29. Liu F., Zhang J., Xu Y., Gao S., Guo Q. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;44(5):1187–1191. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.04.020.
30. Fang W., Xie W., Hsieh J. K., Matuszewski B. K. Development and application of HPLC methods with tandem mass spectrometric detection for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine using 96-well liquid-liquid extraction. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2005;28(17):2681–2703. DOI: 10.1080/10826070500224666.
31. Candesartan. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00796>. Accessed: 18.10.2021.
32. Valsartan. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00177>. Accessed: 18.10.2021.
33. Hydrochloride. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00999>. Accessed: 18.10.2021.
34. Indapamide. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00808>. Accessed: 18.10.2021.
35. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 18.10.2021.
36. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 18.10.2021.



Ингредиенты и добавки

Международная
конференция
и выставка

26–28 апреля 2022

Москва, Технопарк «Сколково»

«Ингредиенты и добавки» — это:

- Масштабная деловая программа с эксклюзивными знаниями из первых рук
- Широкий выбор ингредиентов и добавок для производства товаров повседневного спроса
- Современная выставочная площадка с хорошей транспортной доступностью



Получите бесплатный
электронный билет,
указав промокод:

pharmj21

new.ingred.ru

Организатор



Международная
Выставочная
Компания

+7 (495) 252-11-07
ingred@mvk.ru

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-191-196>
УДК 615.1(075)



Оригинальная статья / Research article

Применение цифровых технологий для целей совершенствования методических подходов к созданию фармацевтической системы качества на предприятиях по выпуску лекарственных средств

В. В. Горячкин¹, В. А. Смирнов^{1*}, В. Н. Шестаков¹, Р. А. Абрамович²

¹ ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

*Контактное лицо: Смирнов Владимир А. E-mail: smirnovs3000@yandex.ru

ORCID: В. В. Горячкин – <https://orcid.org/0000-0002-1069-8647>; В. А. Смирнов – <https://orcid.org/0000-0002-7206-3313>; В. Н. Шестаков – <https://orcid.org/0000-0002-7929-4982>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Статья поступила: 26.05.2021

Статья принята в печать: 20.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Статья посвящена аспектам совершенствования методических подходов к созданию фармацевтической системы качества (ФСК) на предприятиях по выпуску лекарственных средств (ЛС) с учетом возможности применения инструментов и средств цифровизации. Актуальность проведенного исследования связана с непреходящим значением комплексного обеспечения высокого качества при разработке, производстве и выпуске лекарственных средств. Внедрение ФСК требует многочисленных трансформаций управленческих и производственных процессов, содействие которым могут оказать инструменты и элементы цифровизации.

Цель. Рассмотреть потенциал и конкретные сферы применения цифровых технологий для совершенствования методологии и практики разработки и внедрения ФСК.

Материалы и методы. Состояние дел в предметной сфере оценивалось на основании результатов экономико-статистического анализа и прогнозирования внедрения ФСК на российских фармацевтических предприятиях, имеющих положительный и сопоставимо длительный опыт в данной сфере: в компаниях ООО «ОЗОН» и АО «АКРИХИН». Оценка проводилась путем расчета интегрального показателя эффективности функционирования ФСК, представляющего собой набор взвешенных ключевых показателей эффективности (КПЭ) по качеству.

Результаты и обсуждение. Констатируется значимость внедрения ФСК для целей развития фармпредприятий и наличие многочисленных затруднений при внедрении ФСК, что обуславливает необходимость совершенствования методических подходов в предметной сфере. Доказано, что даже на тех предприятиях, где ФСК с той или иной степенью успешности была внедрена, более быстрому, системному и качественному внедрению ФСК поспособствовало бы применение инструментов цифровизации. В числе ключевых сфер применения цифровых инструментов авторами предлагаются мониторинг показателей качества (с применением нейросетевых карт), применение блокчейн платформ, смарт-контрактов для регистрации выпуска ЛС надлежащего качества, регламентации и контроля за порядком внедрения ФСК.

Заключение. Цифровые инструменты способствуют комплексному совершенствованию во многих сферах социально-экономической деятельности. Их активное применение на фармпредприятиях призвано способствовать обеспечению надлежащего внедрения и бесперебойного функционирования фармацевтических систем качества, через постоянный мониторинг качества выпускаемой продукции и регистрацию выпускаемых партий в высокоточных системах хранения информации.

Ключевые слова: фармацевтическая система качества, качество лекарственных средств, цифровые технологии, мониторинг качества, регистрация лекарственных средств, блокчейн, нейросетевые карты, смарт-контракты

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

Вклад авторов. В. В. Горячкин, В. А. Смирнов провели комплексный анализ научной литературы зарубежных и отечественных авторов. Рассмотрено применение цифровых инструментов для мониторинга показателей качества (с применением нейросетевых карт) и применение блокчейн. В. Н. Шестаков, Р. А. Абрамович изучили и систематизировали опыт по внедрению фармацевтической системы качества на отечественных предприятиях АО «АКРИХИН» и ООО «ОЗОН».

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Программы 5-100.

Для цитирования: Горячкин В. В., Смирнов В. А., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А. Применение цифровых технологий для целей совершенствования методических подходов к созданию фармацевтической системы качества на предприятиях по выпуску лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):191–196. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-191-196>

The Use of Digital Technologies for the Purpose of Improving Methodological Approaches to the Creation of a Pharmaceutical Quality System at Enterprises for the Production of Medicines

Vyacheslav V. Goryachkin¹, Vladimir A. Smirnov^{1*}, Vladislav N. Shestakov¹, Rimma A. Abramovich²

¹ State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

² Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Vladimir A. Smirnov. E-mail: smirnovs3000@yandex.ru

© Горячкин В. В., Смирнов В. А., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А., 2021

© Goryachkin V. V., Smirnov V. A., Shestakov V. N., Abramovich R. A., 2021

ORCID: Vyacheslav V. Goryachkin – <https://orcid.org/0000-0002-1069-8647>; Vladimir A. Smirnov – <https://orcid.org/0000-0002-7206-3313>;
Vladislav N. Shestakov – <https://orcid.org/0000-0002-7929-4982>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Received: 26.05.2021 Revised: 20.10.2021 Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. The article is devoted to the aspects of improving methodological approaches to the creation of a pharmaceutical quality system (PQS) at enterprises for the production of medicines, taking into account the possibility of using tools and means of digitalization. The relevance of the study is associated with the enduring importance of comprehensive high quality assurance in the development, production and release of medicines into circulation. The implementation of PQS requires numerous transformations of management and production processes, which can be facilitated by tools and elements of digitalization.

Aim. To consider the potential and specific areas of application of digital technologies to improve the methodology and practice of developing and implementing PQS.

Materials and methods. The state in the subject area was assessed on the basis of the results of economic and statistical analysis and forecasting of the implementation of PQS at Russian pharmaceutical enterprises that have positive and comparatively long experience in this area: the companies LLC "OZON" and JSC "AKRIKHIN". The assessment was carried out by calculating the integral indicator of the effectiveness of the functioning of PQS, which is a set of weighted key performance indicators (KPI) for quality.

Results and discussion. The importance of the introduction of PQS for the development of pharmaceutical enterprises and the presence of numerous difficulties in the implementation of PQS, which necessitates the improvement of methodological approaches in the subject area, are stated. It has been proven that even at those enterprises where PQS has been introduced with varying degrees of success, the use of digitalization tools would contribute to a faster, more systematic and high-quality implementation of PQS. Among the key areas of application of digital tools, the authors propose monitoring of quality indicators (using neural network cards) and the use of blockchain platforms and smart contracts to register the release of drugs of appropriate quality.

Conclusion. Digital tools contribute to complex improvement in many areas of socio-economic activity. Their active use at pharmaceutical enterprises is intended to contribute to ensuring the proper implementation and uninterrupted functioning of pharmaceutical quality systems, through constant monitoring of the quality of manufactured products and registration of manufactured batches in high-precision information storage systems.

Keywords: pharmaceutical quality system, quality of medicines, digital technologies, quality monitoring, registration of medicines, blockchain, neural network cards, smart contracts

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

Contribution of the authors. Vyacheslav V. Goryachkin, Vladimir A. Smirnov, conducted a comprehensive analysis of the scientific literature of foreign and domestic authors. The use of digital tools for monitoring quality indicators (using neural network maps) and the use of blockchain is considered. Vladislav N. Shestakov, Rimma A. Abramovich the experience of implementing a pharmaceutical quality system at domestic enterprises is studied and systematized JSC "AKRIKHIN" and LLC "OZON".

Acknowledgment. This work was supported by Program 5-100.

For citation: Goryachkin V. V., Smirnov V. A., Shestakov V. N., Abramovich R. A. The use of digital technologies for the purpose of improving methodological approaches to the creation of a pharmaceutical quality system at enterprises for the production of medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarnykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):191–196. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-191-196>

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования связана с непреходящим значением комплексного обеспечения высокого качества при разработке, производстве и выпуске в обращение лекарственных средств (ЛС). Важнейшим инструментом комплексного решения поставленной задачи в современных условиях выступает разработка и внедрения фармацевтической системы качества, основанной, прежде всего, на принятии производителем обязательств по соблюдению надлежащих производственных практик (англ. *good manufacturing practices*, GMP) [1]. В системе управления качеством автоматизация традиционно играет повышенную роль [2] прежде всего по причине того, что управление в данной сфере, включая мониторинг и контроль качества, требует осуществления многочисленных аналитических действий, связанных с анализом и обработкой массива информации, далеко не всегда по-

сильных традиционному управленческому труду. В условиях новой индустриальной революции, которая состоялась в 2010-е годы и продолжает происходить в новом десятилетии XXI века, исключительно актуальной задачей становится поиск путей применения цифровых технологий – драйверов цифровых перемен – для совершенствования процессов в различных сферах социального и экономического бытия.

Оценка имеющегося опыта показывает, что внедрение цифровизации на фармацевтических предприятиях Российской Федерации и Евразийского Союза (ЕАЭС), в рамках которого строится единая система обращения ЛС, все еще пробуксовывает, что связано в немалой степени с нехваткой практического опыта, знаний и отраслевых технологий, а также, в некоторой мере, управленческой решимости по внедрению новых высоких технологий. Между тем имеющийся опыт в смежных областях [3–4] убедительно свидетельствует о том, что цифровые технологии могут стать на-

дежным источником неуклонного совершенствования в сфере управления качеством – исключительно важным понять наиболее перспективные направления применения новых знаний и технологий, и на их основе разрабатывать внедренческие проекты. Соответствующим аспектам, применительно к методологии внедрения ФСК на предприятиях ЕАЭС по выпуску ЛС, и посвящена настоящая публикация.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование базируется на диалектическом методе познания трансформирующейся реальности управления качеством выпускаемых ЛС в условиях цифровизации экономики и общества. Отбор перспективных направлений применения цифровых технологий для целей внедрения и функционирования ФСК осуществлен на основе обзора литературных источников с учетом практического опыта работы авторов в российской системе GMP-инспектората, а также комплексного анализа проблем и противоречий, возникавших при внедрении систем GMP/ФСК на предприятиях Российской Федерации по выпуску лекарственных средств – АО «АКРИХИН» и ООО «ОЗОН». Для оценки состояния внедрения ФСК на анализируемых предприятиях использована авторская методология, основанная на определении интегрального показателя эффективности функционирования ФСК, определяемого по формуле (1) (знак по модулю определяется по смыслу показателя как улучшающего или ухудшающего качество):

$$I = \sum_{i=0}^n (|I_{Qn}| \cdot q_{Qn}). \quad (1)$$

Расчет интегрального показателя основан на суммировании частных показателей качества (Q_n) с учетом весовых значений (q_{Qn}), определяемых для конкретного фармацевтического предприятия экспертным путем (пул экспертов включал 5 чел., – 2 представителей GMP-инспектората, 2 представителей ключевого персонала производителя и независимого эксперта с успешным многолетним опытом работы в сфере внедрения ФСК). В качестве частных показателей выбраны наиболее распространенные в практике управления качеством на фармацевтических предприятиях ЕАЭС ключевые показатели эффективности (KPI): Q1 «Серии с первого раза» / Q1 «First pass approval» (FPA); Q2 «Претензии на млн. упаковок» / Q2 «Complaints, per million packs»; Q3 «Плохое качество» / Q3 «Poor quality» (PQ); Q4 «Стоимость плохого качества (брака)» / Q4 «Cost of poor quality/rejects» (CPQ); Q5 «Уровень брака» / Q5 «Rejection rate» (RR).

Для конкретизации проблемных сфер внедрения цифровых технологий в разработку и формирование ФСК применен метод опроса и бесед с ключевым персоналом фармацевтических производителей, ответственным за внедрение ФСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цифровая экономика основывается на применении новейших высокотехнологичных решений и платформ, которые имеют преимущественно сквозной характер. Речь идет о том, что разработки в системе цифровой экономики могут быть применены в различных отраслях социальной или экономической деятельности, для чего, как правило, не требуется существенной адаптации [5]. Соответствующие технологии могут активно применяться для решения проблем в сфере внедрения ФСК на предприятиях ЕАЭС по выпуску ЛС.

Предваряя разработку перспективных инструментов цифровизации GMP/ФСК, представляется целесообразным привести краткие результаты анализа внедрения ФСК на упомянутых выше российских фармацевтических предприятиях, имеющих положительный и сопоставимо длительный опыт в данной сфере: в компаниях АО «АКРИХИН» и ООО «ОЗОН» (рисунок 1).

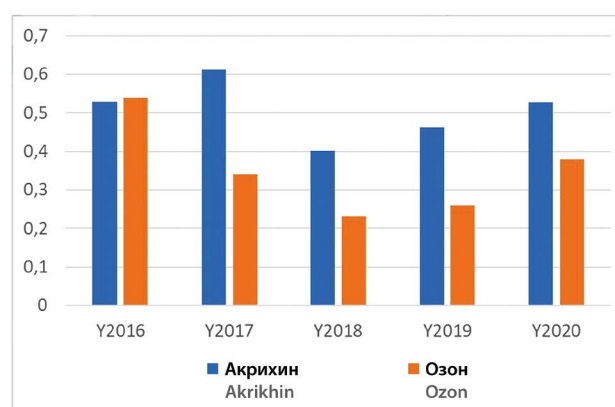


Рисунок 1. Динамика интегрального показателя эффективности ФСК в компаниях АО «АКРИХИН», ООО «ОЗОН» в 2016–2020 гг.

Figure 1. Dynamics of the integral indicator of the efficiency of PQS in the companies JSC "AKRIKHIN", LLC "OZON" in 2016–2020

Анализ показателей позволяет утверждать о том, что состояние управления качеством на фармацевтических предприятиях крайне нестабильное. Говоря о компании АО «АКРИХИН», следует отметить более ранний опыт внедрения ФСК, реализованный с учетом методических и практических наработок у зарубежных партнеров. В 2016–2017 годах наблюдалась инерция от внедрения ФСК, затем имел место некоторый спад в показателях качества, что, по всей видимости, обусловлено «механическим» характером внедрения ФСК: на практике должно иметь место глубокое проникновение философии качества в повседневное управление процессами производства ЛС в сочетании с внедрением неуклонных улучшений в системе качества по типу известной японской кон-

цепции «кайдзен». Вернуться к вопросам необходимости интегрального повышения качества производителя подтолкнула пандемия заболеваний, вызванных новой коронавирусной инфекцией COVID-19, однако утверждать, насколько продолжительным может стать данный искусственный толчок, достаточно сложно. Аналогичные выводы могут быть сделаны в отношении результативности ФСК в компании ООО «ОЗОН», с поправкой, однако, на сравнительно недавний опыт внедрения ФСК в начале-середине 2010-х годов; очевидно, что за исключением первых лет после внедрения, по идентичным причинам произошло падение ключевых показателей качества, притом оно оказалось более существенным в сравнении с конкурентом по причинам недостаточной проработанности элементов ФСК, и некоторое восстановление системных улучшений в 2018–2020 годах, стимулированное не только пандемией, но и активизацией контрольно-мониторинговой деятельности инспектората, обеспечило формирование показателей на уровне более худших, чем у объекта для сравнения.

Более успешное внедрение ФСК в обоих случаях могло бы иметь место при активной поддержке со стороны новых цифровых технологий – и если АО «АКРИХИН» мог воспользоваться новациями лишь в части корректировок по результатам функционирования ФСК, в компании ООО «ОЗОН» соответствующие улучшения могли иметь место непосредственно в процессе внедрения ФСК. Аналогично решения по цифровизации могут применять фармпроизводители ЕАЭС с учетом фактической стадии внедрения ФСК.

Применение цифровых технологий при внедрении и дальнейшем функционировании ФСК ориентировано на комплексное достижение многочисленных задач, среди которых применительно к исследуемой сфере представляется необходимым выделить следующие:

- осуществление высокоточных расчетов показателей качества для разработки улучшений (в том числе с вовлечением неполных данных о конкурентах и ретроспективной аналитической информации, собираемой на основе измененных впоследствии методик);
- формирование надежного и чувствительного мониторинга состояния ФСК на основе цифровых алгоритмов, которое позволило бы в реальном времени идентифицировать ухудшение показателей качества, и не дожидаясь периодической оценки, в том числе со стороны инспектората, производить улучшения.

Как показывают результаты проведенных бесед, руководители и ключевой персонал ФСК знают о соответствующих возможностях лишь в наиболее общих чертах. Из цифровых инструментов наиболее знако-

ма технология блокчейн, однако в отношении такого ее применения, как управление «умными» контрактами, компетенций исполнителей не хватает. Не имея достаточных знаний, и понимая пробелы в компетенциях исполнителей, а также учитывая отсутствие тиражированных («коробочных») решений в отрасли, не готовы принимать соответствующие управленческие решения также руководители направлений/предприятий.

Устранить некоторые пробелы в исследуемой сфере призваны представленные ниже рекомендации по применению цифровых технологий в сфере ФСК. Авторами отобраны две перспективные технологии, представленные ниже, что вовсе не свидетельствует об ограничении спектра перспективных направлений цифровизации в предметной сфере.

Мониторинг показателей качества (с применением нейросетевых карт)

Одной из основных сложностей при создании и дальнейшем функционировании ФСК выступает оценка массива аналитических данных о состоянии управления в сфере качества на фармпредприятиях у конкурентов. Чем больше данных учитывается в итоговом расчете интегрального показателя эффективности ФСК, тем более надежным будет мониторинг качества и разрабатываемые по его результатам направления создания ФСК и улучшения в процессе ее функционирования. Сопоставляя показатели с данными по конкурентам, рынку в целом, представляется возможным достичь более существенных улучшений в предметной сфере. Цифровым инструментом поддержки мониторинга могут выступить эмерджентные нейросетевые карты, основанные на модели нейросетей Кохонена, соответствующие разработки применительно к другим сферам деятельности проводятся и в России [6], и за рубежом [7]. Нейросетевые карты – самообучающиеся нейросети с высоким уровнем вычислительных способностей, связанным с существенным превышением количества узлов обработки данных над числом обрабатываемых свойств, – алгоритм Кохонена кратно превышает конкурирующие технологии аналитической обработки данных по максимально адекватному числу отображаемых свойств (до пятидесяти, в то время как у конкурентов около 10–15 единиц [8]), а представление результатов в виде карты значений позволяет аналитику оперативно и грамотно принимать соответствующие решения. Это позволяет исследовать огромные массивы данных о состоянии системы качества, представленные в различных форматах (а не только количественные показатели), проводить анализ массивов данных с частично или полностью отсутствующими группами показателей, а также при отсутствии четко поставленной задачи (например, «изучить состояние дел у конкурентов»). Преимущест-

вом технологии выступает также то, что результаты анализа наглядно представлены в виде карты, что способствует простоте принятия решений и снижает риски ошибок в интерпретации.

Применение блокчейн платформ и смарт-контрактов для регистрации выпуска ЛС надлежащего качества и регламентации и контроля за порядком внедрения ФСК

Дискуссии о необходимости применения платформы блокчейн для регистрации ЛС ведутся достаточно давно [9], и отраслевое сообщество постепенно приходит к выводу о целесообразности новации. Следует поддержать данную идею, поскольку блокчейн платформа действительно способна обеспечить системный и качественный контроль за выпуском ЛС в обращение и дальнейшим рыночным обращением лекарственных средств. Между тем на основе технологии блокчейн реализована еще одна специфическая сфера – смарт-контракты, которые могут быть использованы для целей конструирования внутренних документов по управлению ФСК, а также связанных с ним процессов, включая, например, подготовку квалифицированного персонала в области ФСК, которая является одной из основных проблем, сдерживающих результативное внедрение ФСК на предприятиях ЕАЭС [10]. На основе смарт-контрактов может быть выстроена системная работа по гибкому конструированию динамичных параметров функционирования систем качества, требований к персоналу и процессам с контролем за соблюдением соответствующих требований в автоматизированном режиме, предполагающим абсолютную независимость и достоверность контроля и принимаемых по его результатам решений.

Содержательные характеристики новых высоких технологий позволяют утверждать о высоком потенциале их применения для целей совершенствования методических подходов к созданию фармацевтической системы качества на предприятиях по выпуску лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение цифровых технологий, большая часть которых имеет истинно «сквозной» характер, исключительно направлено на обеспечение системных улучшений в различных сферах социальной и экономической деятельности, в том числе в сфере управления качеством на фармацевтических предприятиях по выпуску ЛС. Низкий уровень цифровизации при внедрении ФСК не способствует стабильности при реализации имеющихся решений, соответствующие аспекты должны быть учтены как при совершенствовании ранее реализованных про-

ектов по внедрению ФСК, так и в новых проектах. Среди предпочтительных высоких цифровых технологий, призванных содействовать непрерывным улучшениям в сфере ФСК, представленных и обсужденных в настоящей публикации, – эмерджентные нейросетевые карты (основная сфера применения – мониторинг показателей качества), блокчейн платформы (для регистрации выпуска ЛС надлежащего качества), а также смарт-контракты (для регламентации и контроля за порядком внедрения ФСК). Активное внедрение представленных технологий на фармпредприятиях ЕАЭС по выпуску ЛС призвано способствовать обеспечению надлежащего внедрения и бесперебойного функционирования фармацевтических систем качества через постоянный мониторинг качества выпускаемой продукции и регистрацию выпускаемых партий в высокоточных системах хранения информации.

Перспективными направлениями исследований по рассмотренной проблематике выступает оценка применимости других технологий цифровой экономики для содействия разработки и внедрению ФСК, в том числе на стадиях проектирования, нормирования и мониторинга внедрения; в перечень таковых, помимо рассмотренных в настоящей публикации, могут войти различные инструменты и решения на базе искусственного интеллекта. Кроме того, представленные материалы не следует расценивать лишь как информацию для размышления, а следует рассматривать как руководство для практических разработок и их применения в системе управления качеством при выпуске лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar K. Good Documentation Practices (GDPs) in Pharmaceutical Industry. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 2017;4(2):00100. DOI: 10.15406/japlr.2017.04.00100.
2. Izmaylov A., Saraev A., Barinova Z. The Development of the Domestic Pharmaceutical Industry in the Context of Digitalization. In: *Current Achievements, Challenges and Digital Chances of Knowledge Based Economy*. New York: Springer. 2020. P. 181–188. DOI: 10.1007/978-3-030-47458-4_21.
3. Bravi L., Murmura F., Santos G. Additive Manufacturing: Possible Problems with Indoor Air Quality. *Procedia Manufacturing*. 2019;41:952–959. DOI: 10.1016/j.promfg.2019.10.020.
4. Яковлев А. А., Лебедева Т. С. Применение концепции *Block Chain* в целях совершенствования системы управления качеством на предприятии. *Петербургский экономический журнал*. 2020;4:167–176. DOI: 10.24411/2307-5368-2020-10050.
5. Leal F., Chis A. E., Caton S., González-Vélez H., García-Gómez, J. M., Durá M., Sánchez-García A., Sáez C., Karageorgos A., Gerogiannis V. C., Xenakis A., Lallas E., Ntounas T., Vasileiou E., Mountzouris G., Otti B., Pucci P., Papini R., Cerrai D., Mier M. Smart Pharmaceutical Manufacturing: Ensuring End-to-End Traceability and Data Integrity in Medicine Production. *Big Data Research*. 2021;24:100172. DOI: 10.1016/j.bdr.2020.100172.
6. Дроговоз П. А., Садовская Т. Г., Шиболденков В. А., Попович А. Л. Разработка нейросетевых инструментов интеллектуального анализа экономических показателей. *Аудит и финансовый анализ*. 2015;3:432–440.
7. Nanda T., Sahoo B., Chatterjee C. Enhancing the applicability of Kohonen Self-Organizing Map (KSOM) estimator for gap-filling

- in hydrometeorological timeseries data. *Journal of Hydrology*. 2017;549:133–147. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2017.03.072.
8. Дроговоз П. А., Садовская Т. Г., Шиболденков В. А. Использование эмерджентных нейросетевых карт в бизнес-анализе портфеля клиентов. *Вестник компьютерных и информационных технологий*. 2016;12(150);10–18.
9. Кошечкин К. А., Преферанский Н. Г., Преферанская Н. Г. Применение блокчейн-технологии для ведения реестра лекарственных препаратов. *Врач и информационные технологии*. 2019;3:58–64.
10. Смирнов В. А., Горячкин В. В., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А. Методические рекомендации по содействию внедрению фармацевтических систем качества на предприятиях ЕАЭС через управление вовлеченностью производственного персонала. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):136–141. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-136-141.
5. Leal F., Chis A. E., Caton S., González-Vélez H., García-Gómez, J. M., Durá M., Sánchez-García A., Sáez C., Karageorgos A., Gerogiannis V. C., Xenakis A., Lallas E., Ntounas T., Vasileiou E., Mountzouris G., Otti B., Pucci P., Papini R., Cerrai D., Mier M. Smart Pharmaceutical Manufacturing: Ensuring End-to-End Traceability and Data Integrity in Medicine Production. *Big Data Research*. 2021;24:100172. DOI: 10.1016/j.bdr.2020.100172.
6. Drogovoz P. A., Sadovskaya T. G., Shiboldenkov V. A., Popovich, A. L. Development of neural network tools for data mining of economic indicators. *Audit i finansovyy analiz*. 2015;3:432–440. (In Russ.)
7. Nanda T., Sahoo B., Chatterjee C. Enhancing the applicability of Kohonen Self-Organizing Map (KSOM) estimator for gap-filling in hydrometeorological timeseries data. *Journal of Hydrology*. 2017;549:133–147. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2017.03.072.
8. Drogovoz P. A., Sadovskaya T. G., Shiboldenkov V. A. Using the emergent neural network maps in customer portfolio business analysis. *Vestnik komp'iuternykh i informatsionnykh tekhnologii = Herald of computer and information technologies*. 2016;12(150);10–18. (In Russ.)
9. Koshechkin K. A., Preferansky N. G., Preferanskaya N. G. The use of blockchain-technology for maintaining the state register of medicines. *Vrach i informatsionnye tekhnologii*. 2019;3:58–64. (In Russ.)
10. Smirnov V. A., Goryachkin V. V., Shestakov V. N., Abramovich R. A. Guidelines for Promoting the Implementation of Pharmaceutical Quality Systems at EAEU Enterprises Through the Management of the Engagement of Production Personnel. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):136–141. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-136-141.

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-197-207>
УДК 615.013



Оригинальная статья / Research article

Альтернативные методы расчета сопоставимости профилей растворения при проведении теста сравнительной кинетики растворения

Д. П. Ромодановский*, Д. В. Горячев

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Ромодановский Дмитрий Павлович. E-mail: romodanovsky@csa.expert

ORCID: Д. П. Ромодановский – <https://orcid.org/0000-0002-2980-4518>; Д. В. Горячев – <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>.

Статья поступила: 10.08.2021

Статья принята в печать: 12.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. В статье рассмотрена задача оценки сходства профилей растворения двух серий лекарственного препарата небиволола. Применение общепринятого фактора сходимости для оценки эквивалентности не приемлемо в ряде случаев, например, для препаратов с высокой вариабельностью значений высвобождения действующего вещества из лекарственной формы. Вместе с тем в настоящее время отсутствуют общепризнанные подходы к сравнению профилей кинетики растворения лекарственных препаратов за исключением метода оценки сопоставимости профилей на основе математического расчета фактора сходимости f_2 , который имеет определенные критерии, ограничивающие его применение.

Цель. Продемонстрировать альтернативные методы оценки сходства между профилями растворения двух лекарственных препаратов на практическом примере.

Материалы и методы. В качестве материалов в работе использованы результаты теста сравнительной кинетики растворения двух серий препарата небиволола в дозировке 5 мг. Были использованы четыре модель-независимые методики оценки эквивалентности растворения лекарственных препаратов. Статистическая обработка данных выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. В работе представлен практический пример использования четырех альтернативных модель-независимых методов оценки эквивалентности профиля высвобождения. Пример используется для иллюстрации предлагаемых пределов эквивалентности и статистической методологии. Также предложены различные подходы к определению границ эквивалентности для оценки сходства профилей растворения действующего вещества.

Заключение. Согласно результатам теста сравнительной кинетики растворения двух серий препарата небиволола, показано, что применение фактора сходимости f_2 в качестве критерия оценки профилей растворения привело к ложно положительному результату. В таких случаях следует рассмотреть возможность применения альтернативных методов оценки эквивалентности профилей растворения, описанных в статье, или иных методов, представленных в научной литературе, с обоснованием их приемлемости в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: тест сравнительной кинетики растворения, профиль растворения, фактор различия, фактор сходимости, модельно-независимые методы оценки эквивалентности

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

Вклад авторов. Д. П. Ромодановский – идея, планирование исследования, написание всех разделов, редактирование текста, анализ и интерпретация результатов работы. Д. В. Горячев – планирование исследования, утверждение окончательного варианта статьи для публикации, решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Для цитирования: Ромодановский Д. П., Горячев Д. В. Альтернативные методы расчета сопоставимости профилей растворения при проведении теста сравнительной кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):197–207. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-197-207>

Alternative Methods for Dissolution Profile Comparison in the Dissolution Test

Dmitry P. Romodanovsky*, Dmitry V. Goryachev

FSBI "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovsky blvd., Moscow, 127051, Russia

*Corresponding author: Dmitry P. Romodanovsky. E-mail: romodanovsky@csa.expert

ORCID: Dmitry P. Romodanovsky – <https://orcid.org/0000-0002-2980-4518>; Dmitry V. Goryachev – <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>.

Received: 10.08.2021

Revised: 12.11.2021

Published: 25.11.2021

Abstract

Introduction. The article discusses the problem of assessing the similarity of the dissolution profiles of two batches of the nebivolol. The use of a generally accepted similarity factor for assessing equivalence is unacceptable in some cases, for example, for drugs with a high variability in the values of the release of the active substance from the formulation. At the same time, at present, there are no generally accepted approaches to

© Ромодановский Д. П., Горячев Д. В., 2021

© Romodanovsky D. P., Goryachev D. V., 2021

comparing the profiles of the dissolution kinetics of drugs, with the exception of the method for assessing the comparability of profiles based on the mathematical calculation of the similarity factor f_2 , which has certain criteria that limit its application.

Aim. To demonstrate alternative methods for assessing the similarity between the dissolution profiles of two drugs using a practical example.

Materials and methods. The results of the comparative dissolution test of two series of nebivolol at a dosage of 5 mg. Five model-independent methods for assessing the equivalence of drug dissolution were used. Statistical data processing was performed using Microsoft Excel software.

Results and discussion. The paper presents a practical example of using five alternative model-independent methods for assessing the equivalence of the dissolution profile. An example is used to illustrate the proposed equivalence limits and statistical methodology. Also, various approaches to determining the boundaries of equivalence have been proposed to assess the similarity of the dissolution profiles of an active substance.

Conclusion. According to the results of the comparative dissolution test of two batches of nebivolol, it was shown that the use of the similarity factor as a criterion for assessing dissolution profiles led to a false positive result. In such cases, the possibility of using alternative methods for assessing the equivalence of dissolution profiles described in the article, or other methods presented in the scientific literature, should be considered, with a justification of their acceptability in each specific case.

Keywords: dissolution test, dissolution profile, difference factor, similarity factor, model-independent methods for evaluating equivalence

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

Contribution of the authors. Dmitry P. Romodanovsky – elaboration of the study idea, planning of the study, writing of all parts of the paper, editing of the text, analysis and interpretation of the study results. Dmitry V. Goryachev – planning of the study, approval of the final version of the paper for publication, handling issues related to the reliability of the data and integrity of all parts of the paper.

Acknowledgment. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

For citation: Romodanovsky D. P., Goryachev D. V. Alternative methods for dissolution profile comparison in the dissolution test. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):197–207. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-197-207>

ВВЕДЕНИЕ

Тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР) является как технологическим, так и биофармацевтическим методом оценки качества лекарственных препаратов, отражающим кинетику растворения фармацевтической субстанции при высвобождении ее из лекарственной формы препарата, т. е. концентрацию вещества в растворе через определенный промежуток времени [1].

Существует определенная взаимосвязь между биодоступностью пероральных лекарственных препаратов *in vivo* и растворением *in vitro*. Исследования биодоступности (биоэквивалентности) предоставляют полезную информацию о скорости и степени абсорбции лекарственного средства у людей, в то время как тест сравнительной кинетики растворения обеспечивает быструю оценку скорости и степени высвобождения лекарственного средства (действующего вещества) из готовой лекарственной формы препарата. Для того чтобы действующее вещество всосалось и достигло места своего действия необходимо, чтобы оно перешло из твердой лекарственной формы препарата в раствор. Поэтому при разработ-

ке лекарственного препарата необходимо получить подходящие характеристики растворения препарата. В связи с этим принято, что проведение тестирования растворения необходимо, чтобы оценить, соответствует ли лекарственный препарат определенным критериям по степени и скорости растворения; чтобы гарантировать, что определенное количество действующего вещества лекарственного препарата оказалось доступно для всасывания. В некоторых случаях тест сравнительной кинетики растворения *in vitro* может использоваться в качестве замены исследования биоэквивалентности *in vivo*, например таких, как незначительные изменения состава вспомогательных веществ лекарственного препарата или производственного оборудования, изменения производственного участка (места производства), масштабирование производственных серий препарата, обоснование диапазона спецификации растворения, при регистрации нескольких дозировок одного и того же лекарственного препарата [2].

Еще в 1995 году Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для сравнения профилей растворения между сравниваемыми лекарственными препара-

ратами была предложена математическая модель на основе расчета фактора сходимости (f_2)^{1,2} [3, 4].

Данная методика не потеряла актуальность и установлена в качестве основного инструмента количественной оценки эквивалентности профилей высвобождения исследуемого препарата и препарата сравнения Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза»³.

Несмотря на то, что фактор сходимости стал уже международным инструментом для сравнения профилей кинетики растворения *in vitro*, существуют значимые глобальные регуляторные различия в определении эквивалентности с использованием подхода фактора сходимости. Это касается, например, критерия «значение величины относительного стандартного отклонения (residual standard deviation, RSD) количества высвободившегося лекарственного вещества в первой временной точке не превышает 20 %, для остальных временных точек не превышает 10 %». В Южной Корее данная норма заменена на 15 % для всех временных точек, в Таиланде не установлена норма RSD для первой временной точки. Также имеются различия в определении последней временной точки, в которой высвобождение достигло 85 % (когда достигнуто высвобождение у обоих сравниваемых препаратов, когда высвобождение достигнуто только для референтного препарата, или когда данное высвобождение достигнуто у любого из сравниваемых препаратов) [5].

Показано, что фактор сходимости не способен сравнить форму профилей растворения, учесть факт неполного высвобождения, временную корреляцию, а также не восприимчив к значениям – «выбросам», что приводит к ложноположительным результатам теста. С учетом требований к значениям RSD в первой и последующих временных точках данный критерий не может применяться для препаратов, которые демонстрируют высокую вариабельность [6].

¹ Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing and In Vivo BE Documentation. Rockville, MD: U S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: 1995.

² Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 1997.

³ Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/ria/ru-ru/0121136/ria_30062015_att.pdf. Ссылка активна на 04.05.2021.

В научной литературе были предложены различные подходы к решению данных проблем: модельно-независимые и модельно-зависимые методы [фактор различия (f_1), функция распределения Вейбулла, сравнение степеней высвобождения в разных временных точках (например, по *t*-критерию Стьюдента)] [6].

Однако большинство методов столкнулись с трудностями отсутствия четко определенных пределов эквивалентности и корреляции между последовательными временными точками. В случае использования модельно-зависимых методов остаются нерешенными вопросы, которые ограничивают их применение [2]. Например, не ясно, какую модель следует выбрать среди их множества. Costa et al. в своей работе описывают более 10 моделей, предлагаемых для описания и сравнения профилей растворения [7]. В большинстве работ отсутствует четкое и пошаговое описание применения конкретных моделей для реализации их на практике. Как правило, они сложны для их понимания и реализации. Кроме того, тестируемый препарат может не соответствовать той же модели, что и референтный препарат [2]. Поэтому до настоящего времени отсутствуют общепризнанные международным научным обществом альтернативные методы оценки сопоставимости профилей кинетики растворения.

Среди множества научных работ, посвященных разработке методики сравнения профилей растворения, можно выделить работу Chow и соавторов (1997), в которой был предложен метод на основе подхода оценки биоэквивалентности лекарственных препаратов *in vivo*. Два препарата считаются эквивалентными по профилям растворения, если соотношение скоростей растворения находится в некоторых пределах эквивалентности. Если два лекарственных препарата эквивалентны по профилям растворения, это означает, что они имеют аналогичные (или сопоставимые) профили растворения. Данный подход учитывает корреляцию между результатами растворения в разные моменты времени. Было показано, что предложенная модель пригодна для оценки сходства профилей растворения двух лекарственных препаратов. Также авторами были предложены критерии к определению границы эквивалентности для сравнения ТСКР, данный подход позволяет устанавливать локальную сопоставимость профиля высвобождения в каждой временной точке [2]. Описанная модель понятна, проста для выполнения расчетов и не требует специализированного программного обеспечения.

Также в научной литературе широко обсуждается метод на основе процедуры двух односторонних тестов (TOST), многомерный метод анализа и методология бутстрэпа для f_2 [6].

Актуальность работы обусловлена отсутствием общепризнанных подходов к сравнению профилей кинетики растворения лекарственных препаратов, за исключением метода оценки сопоставимости профилей на основе математического расчета фактора сходимости, который имеет определенные критерии к ограничению его применения.

Целью данной статьи является продемонстрировать альтернативные методы оценки сходства между профилями растворения двух лекарственных препаратов на практическом примере.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов в работе использованы результаты теста сравнительной кинетики растворения препаратов двух серий с действующим веществом небиволол в дозировке 5 мг, согласно базе данных ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Сведения обезличены для сохранения конфиденциальности данных. Результаты высвобождения действующего вещества в среде растворения 0,1 М HCl представлены в таблице 1. Условия выполнения теста соответствовали общепринятым критериям и фармакопее ЕАЭС. Количество единиц дозирования (n) составило 12. Период времени растворения составил 20 минут, всего было 3 временные точки (T) – 10, 15 и 20 минут.

Таблица 1. Высвобождение небиволола в среде растворения 0,1 М HCl из двух серий препарата

Table 1. Release of nebivolol in 0.1 M HCl dissolution medium from two batches of the drug

	табл./время tablet/time	% растворенного небиволола % dissolved nebivolol		
		10 минут 10 minutes	15 минут 15 minutes	20 минут 20 minutes
Серия 1 Batch 1	1	49,61	85,65	90,91
	2	56,70	75,73	88,54
	3	74,96	82,10	90,12
	4	83,06	92,45	94,67
	5	52,79	67,81	71,63
	6	75,11	86,58	94,62
	7	74,96	89,34	94,02
	8	92,47	96,99	98,53
	9	77,42	90,45	92,90
	10	68,18	76,20	79,94
	11	66,52	72,76	76,04
	12	42,51	66,40	73,48
	Среднее Mean	67,86	81,87	87,12
	RSD	21,82	12,19	10,67
Серия 2 Batch 2	1	82,69	93,45	96,33
	2	66,53	77,06	86,67
	3	73,35	83,68	86,31
	4	70,87	92,51	96,10
	5	60,78	71,17	75,86
	6	69,44	76,27	80,43
	7	60,18	86,80	90,11
	8	59,17	65,35	70,10
	9	75,48	80,15	84,19
	10	65,39	72,67	76,34
	11	52,60	68,85	75,13
	12	67,93	77,06	80,92
	Среднее Mean	67,03	78,75	83,21
	RSD	12,21	11,36	9,99

Примечание. Табл. – 1 таблетка (единица дозирования); мин – минуты; Mean – среднее арифметическое; RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. Tab. – 1 tablet (dosage unit); min – minutes; Mean – arithmetic mean; RSD – residual standard deviation.

В качестве методов сравнения профилей растворения в работе были использованы модель-независимые методы: метод разработанный Chow и соавторами, позволяющий оценивать весь профиль растворения во всех временных точках; метод на основе двух односторонних тестов (TOST) для сравнения степени высвобождения небиволола в каждой временной точке.

Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Excel (Office 365): рассчитаны показатели описательной статистики, выполнены двухвыборочные t -тесты с различными дисперсиями, рассчитаны доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены примеры ТСКР двух серий небиволола. В качестве исследуемого препарата была серия 1, в качестве препарата сравнения – серия 2. На рисунке 1 представлен график профиля растворения двух серий препарата с действующим веществом небиволол. В целях пострегистрационных изменений сравнивали профили высвобождения действующего вещества с оценкой фактора сходности f_2 , который продемонстрировал эквивалентность ($f_2 = 75,5$). Однако, как видно из таблицы, были нарушены критерии приемлемости применения данного метода сравнения профилей растворения, т. к. значения RSD превышали 20 % для первой временной точки, и превышали 10 % для последующих точек¹.

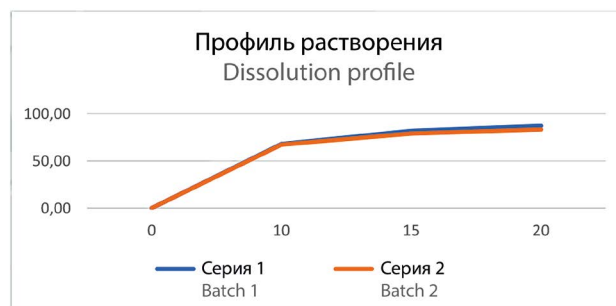


Рисунок 1. Профиль растворения двух серий препарата небиволола

Figure 1. Dissolution profile of two batches of nebivolol

Поэтому профили растворения в данном случае необходимо оценивать используя альтернативные методы, при этом необходимо заранее определить и обосновать пределы приемлемости критерия сопоставимости, который не должен превышать 10 %².

¹ Приложение № 5 Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». С. 57–62. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/ria/ru-ru/0121136/ria_30062015_att.pdf. Ссылка активна на 04.05.2021.

² Там же.

Границы эквивалентности

Некоторые авторы предлагают определять пределы приемлемости на основе критерия показателя «Растворение» указанных в спецификации препарата сравнения [2]. В качестве пределов эквивалентности могут быть использованы соответствующие доверительные интервалы для средних значений высвобождения действующего вещества из препарата сравнения (рекомендуется учитывать несколько серий) в каждой временной точке. Также возможно использовать пределы эквивалентности аналогичные пределам, устанавливаемым в исследованиях биоэквивалентности, но с учетом не более чем 10 % различий между сравниваемыми препаратами (в исследованиях биоэквивалентности допускаются 20 % различия).

1. Согласно спецификации, норма показателя «Растворение» для препарата небиволола, приведенного в примере, растворение составляет не менее 75 % (Q) через 45 минут. Соответственно согласно работе Chow и соавторов (1997 г.), для оценки эквивалентности приняты следующие границы доверительного интервала – 87,50–114,3 % [2]. Они демонстрируют 5 % различия (δ) от нормы показателя спецификации лекарственного препарата, согласно уравнениям $L = Q - \delta/Q + \delta$ и $U = Q + \delta/Q - \delta$.
2. Границы эквивалентности высвобождения для каждой временной точки, согласно подходу Chow и соавторов (1997 г.), также должны находиться в пределах 87,50–114,3 % [2]. Однако учитывая, что, как правило, в первых временных точках высвобождение не достигает 75 %, то для данных временных точек попасть в данный установленный диапазон не представляется возможным.

В связи с этим более логичным выглядит установление границ эквивалентности, исходя из соответствующих доверительных интервалов для средних значений высвобождения действующего вещества из препарата сравнения ($\bar{R}_t$).

Например, если модифицировать вышеприведенные уравнения на $L = \bar{R}_t - \delta/\bar{R}_t + \delta$ и $U = \bar{R}_t + \delta/\bar{R}_t - \delta$ исходя из значений среднего высвобождения серии под условным обозначением № 2 из таблицы 1, получаются следующие границы эквивалентности (таблица 2).

Более точные границы можно получить рассчитав доверительные интервалы для отношений средних значений высвобождения двух серий препарата сравнения в каждой временной точке.

3. Используя подход, аналогичный исследованиям биоэквивалентности, с учетом различий не более 5 % границы эквивалентности составляют 95,00–105,26 %, с учетом различий не более 10 % – 90,00–111,11 %.

Таблица 2. Границы эквивалентности для каждой временной точки

Table 2. Boundaries of equivalence for each time point

Время, минуты Time, minutes	10	15	20
$\bar{R}_t$	67,03	78,75	83,21
δ	5 %	5 %	5 %
L	86,12 %	88,06 %	88,66 %
U	116,12 %	113,56 %	112,79 %

Примечание. $\bar{R}_t$ – средние значения высвобождения действующего вещества из препарата сравнения; δ – различия от нормы показателя спецификации лекарственного препарата; L – нижняя граница; U – верхняя граница.

Note. $\bar{R}_t$ – average values of the release of the active substance from the reference drug; δ – differences from the norm of the drug product specification; L – lower limit; U is the upper limit.

Методы оценки эквивалентности

Метод Chow и соавторов.

Цель метода состоит в том, чтобы оценить сходство между средними значениями растворения (высвобождения действующего вещества) исследуемого (Test) и референтного (Ref) препарата в наблюдаемых временных точках отбора проб (t).

Мерой различия между Test и Ref служит отношение процентной доли высвободившегося действующего вещества из лекарственной формы исследуемого препарата к процентной доле высвободившегося действующего вещества из лекарственной формы референтного препарата для каждой единицы дозирования, в каждый момент времени. В примере, использованном в данной работе, количество единиц дозирования составило 12 таблеток ($n = 12$), количество временных точек – 3 [$t = 1$ (10 минут), $t = 2$ (15 минут), $t = 3$ (30 минут)]. Т. е. отношение Test/Ref для 2-й единицы дозирования (таблетки № 2) в момент времени $t = 2$ равно 0,98 (см. таблицу 3, ячейка выделена серым цветом). Это отношение выражает относительную скорость растворения в точке i и времени t . Истинная относительная скорость растворения обозначается γ_{ti} (R_{ti}) в уравнениях Chow и соавторов.

В таблицах 4 и 5 представлены расчеты основных показателей для построения доверительных интервалов для всего профиля растворения двух серий препарата небиволола по формулам предложенным Chow и соавторами.

Ниже приведены формулы для расчета доверительных интервалов исходя из представленных выше показателей:

1. Для сравнения препаратов в каждой временной точке используются соответствующие средние значения γ_t ($\gamma_t = \Sigma \gamma_{ti}/n$), а также среднее значение всех средних значений γ ($\gamma = \Sigma \gamma_t/n$) и значения их дисперсии.

Таблица 3. Относительная скорость растворения и ключевые математические переменные

Table 3. Relative dissolution rate and key mathematical variables

№ единицы дозирования № dosage unit	время (мин)/относительная скорость высвобождения time (min)/relative release rate		
	10	15	20
1	0,60	0,92	0,94
2	0,85	0,98	1,02
3	1,02	0,98	1,04
4	1,17	1,00	0,99
5	0,87	0,95	0,94
6	1,08	1,14	1,18
7	1,25	1,03	1,04
8	1,56	1,48	1,41
9	1,03	1,13	1,10
10	1,04	1,05	1,05
11	1,26	1,06	1,01
12	0,63	0,86	0,91
Среднее Mean	1,03	1,05	1,05

Таблица 4. Значения основных параметров для оценки всего профиля высвобождения

Table 4. Values of the main parameters for the assessment of the entire release profile

	$\bar{R}_i$	$\hat{\phi}_i$	$\hat{\psi}_i^2$	$\sum_{i=1}^n \hat{\psi}_i^2 \left(1 + 2 \sum_{k=1}^{T-1} \frac{T-k}{T} \hat{\phi}_i^k \right)$
1	0,82	-0,127	0,037	0,030
2	0,95	-0,059	0,008	0,007
3	1,02	-0,586	0,001	0,001
4	1,05	-0,129	0,011	0,009
5	0,92	-0,222	0,002	0,002
6	1,13	-0,004	0,002	0,002
7	1,11	-0,201	0,015	0,012
8	1,48	0,000	0,006	0,005
9	1,09	-0,316	0,003	0,002
10	1,05	-0,313	0,000	0,000
11	1,11	-0,081	0,018	0,015
12	0,80	-0,087	0,023	0,019
Сумма Sum	б/о n/a	-2,128	0,125	0,030
Среднее Mean	1,04	б/о	б/о	б/о

Примечание. б/о – без оценки; $\bar{R}_i$ – среднее значение относительной скорости растворения каждой единицы дозирования ($n=12$); $\hat{\phi}_i$ и $\hat{\psi}_i^2$, параметры для определения стандартной ошибки дисперсии (SE), рассчитываются по формулам

$$\hat{\phi}_i = \frac{\sum_{t=1}^{T-1} (R_{ti} - \bar{R}_i)(R_{(t+1)i} - \bar{R}_i)}{\sum_{t=1}^T (R_{ti} - \bar{R}_i)^2} \quad \text{и} \quad \hat{\psi}_i^2 = \frac{1}{T-1} \sum_{t=1}^T (R_{ti} - \bar{R}_i)^2; \quad T - \text{количество временных точек; } i - \text{номер каждой единицы дозирования; } k - \text{коэффициент равный 1.}$$

во временных точек; i – номер каждой единицы дозирования; k – коэффициент равный 1.

Note. n/a – no assessment; $\bar{R}_i$ – is the average value of the relative dissolution rate of each dosage unit ($n=12$); $\hat{\phi}_i$ and $\hat{\psi}_i^2$ – parameters for determining the standard error of variance (SE), calculated by the

$$\text{formulas} \quad \hat{\phi}_i = \frac{\sum_{t=1}^{T-1} (R_{ti} - \bar{R}_i)(R_{(t+1)i} - \bar{R}_i)}{\sum_{t=1}^T (R_{ti} - \bar{R}_i)^2} \quad \text{and} \quad \hat{\psi}_i^2 = \frac{1}{T-1} \sum_{t=1}^T (R_{ti} - \bar{R}_i)^2;$$

T is the number of time points; i is the number of each dosage unit; k – coefficient equal to 1.

Таблица 5. Значения основных параметров для оценки эквивалентности растворения и формулы для расчета

Table 5. Values of the main parameters for assessing the equivalence of dissolution and the formula for calculation

Параметр Parametr	Формула расчета Calculation formula	Значение Value
Оценка локальной эквивалентности Local equivalence assessment		
$\hat{\sigma}_R^2$	$\hat{\sigma}_R^2 = \frac{1}{T(n-1)} \sum_{t=1}^T \sum_{i=1}^n (R_{ti} - \bar{R}_t)^2$	0,0389
s^2	$s^2 = \frac{1}{T-1} \sum_{t=1}^T (\bar{R}_t - \bar{R})^2$	$0,0142 \cdot 10^2$
$\hat{\tau}^2$	$\hat{\tau}^2 = \max(0, s^2 - \sigma_R^2/n)$	0,0031
Оценка всего профиля высвобождения при равенстве R_{ti} Assessment of the entire release profile with equality R_{ti}		
SE	$SE(\hat{\gamma}) = \left\{ \frac{1}{n^2 T} \sum_{i=1}^n \hat{\psi}_i^2 \left(1 + 2 \sum_{k=1}^{T-1} \frac{T-k}{T} \hat{\phi}_i^k \right) \right\}^{1/2}$	0,0155
Оценка всего профиля высвобождения при неравенстве R_{ti} Assessment of the entire release profile in case of inequality R_{ti}		
$\sigma_{\hat{\gamma}}$	$\sigma_{\hat{\gamma}} = \left(\frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n \frac{\hat{\psi}_i^2}{T} \left\{ 1 + 2 \sum_{k=1}^{T-1} \frac{T-k}{T} \hat{\phi}_i^k \right\} + \frac{1}{T} \tau^2 \right)^{1/2}$	0,0312
τ	$\tau = \left[\frac{1}{nT-1} \sum_{i=1}^n \sum_{t=1}^T (R_{ti} - \bar{R})^2 - \frac{1}{n(T-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{t=1}^T (R_{ti} - \bar{R}_i)^2 \right]^{0.5}$	0,1624

Примечание. Расчеты по указанным формулам были реализованы с помощью Microsoft Excel (Office 365).

Note. Calculations according to the specified formulas were implemented using Microsoft Excel (Office 365).

Определяют доверительные интервалы в каждой временной точке согласно следующей формуле расчета $(1 - \alpha) \cdot 100$ % доверительного интервала:

$$L = \hat{\gamma}_t - \left\{ \frac{\hat{\sigma}_R^2/n}{s^2} \right\} \cdot (\hat{\gamma}_t - \hat{\gamma}) - z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) \sqrt{\frac{\hat{\tau}^2 \hat{\sigma}_R^2}{ns^2}},$$

$$U = \hat{\gamma}_t + \left\{ \frac{\hat{\sigma}_R^2/n}{s^2} \right\} \cdot (\hat{\gamma}_t - \hat{\gamma}) + z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) \sqrt{\frac{\hat{\tau}^2 \hat{\sigma}_R^2}{ns^2}},$$

где $z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right)$ это – $(1 - \alpha)$ верхний квантиль стандартного нормального распределения (его значение равно 1,96); α – ошибка I рода (5 %); τ^2 – это диспер-

сигма квадрата дисперсии (его значение равно 1,96); α – ошибка I рода (5 %); τ^2 – это диспер-

сия среднего $\bar{y}$ с учетом расчета для каждого момента времени; σ_R^2 – это дисперсия среднего $\bar{y}$; s^2 – это сумма дисперсии τ^2 и отношения дисперсии σ_R^2 к количеству изученных единиц дозирования – n ; L – нижняя граница доверительного интервала; U – верхняя граница доверительного интервала. Формула незначительно модифицирована в сравнении с оригинальной для упрощения понимания и использования единых обозначений в данной статье.

2. Для сравнения всего профиля высвобождения за весь временной период теста используется среднее значение $\bar{y}$ ($\bar{y} = \sum R_{ti}/n$) всех средних значений R_{ti} ($R_{ti} = \sum R_{tji}/T$), полученных для каждой единицы дозирования за общее количество временных точек ($T = 3$), и стандартная ошибка среднего (SE).

В случае предположения о равенстве R_{ti} в каждый момент времени t [то есть случаи, когда профили растворения очень близки (значения R_{ti} близки к 1)] используется формула расчета доверительного интервала для $\bar{y}$:

$$L = \hat{\bar{y}} - z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) SE(\hat{\bar{y}}),$$

$$U = \hat{\bar{y}} + z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) SE(\hat{\bar{y}}),$$

где $z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right)$ это – $(1 - \alpha)$ верхний квантиль стандартного нормального распределения (его значение равно 1,96); α – ошибка I рода (5 %); SE – это стандартная ошибка среднего (мера дисперсии $\bar{y}$).

В случае неравенства R_{ti} в каждый момент времени t [то есть случаи, когда профили растворения отличаются (например, значения R_{ti} отличаются на 5 % от 1)] используется формула расчета доверительного интервала для среднего $\bar{y}$:

$$L = \hat{\bar{y}} - z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) (\sigma_{\bar{y}} + \tau),$$

$$U = \hat{\bar{y}} + z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right) (\sigma_{\bar{y}} + \tau),$$

где $z \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right)$ это – $(1 - \alpha)$ верхний квантиль стандартного нормального распределения (его значение равно 1,96); α – ошибка I рода (5 %); $\sigma_{\bar{y}}$ и τ – это мера дисперсии $\bar{y}$, рассчитанной для каждой единицы дозирования с учетом неравенства R_{ti} в каждый момент времени t .

В основе метода Chow и соавторов лежит статистическая гипотеза об эквивалентности сравниваемых препаратов (препараты имеют одинаковое растворение) и альтернативная гипотеза об отсутствии эквивалентности (имеются различия растворения).

Решение о принятии или отклонении гипотезы о том, что две серии сравниваемых препаратов имеют одинаковое растворение, основывается на доказательствах того, является ли разница в средних значениях растворения (высвобождения действующего вещества) между тестируемым и референтным препаратами не больше, чем максимальная ожидаемая разница между любыми двумя партиями зарегистрированного препарата. Причем применяется жесткий критерий – разница не более 5 %.

Исходя из данных о растворении, видно, что использовать подход, предполагающий равенство R_{ti} в каждый момент времени t , не приемлемо, так как значения растворения отличаются у сравниваемых серий небиволола в некоторых временных точках более чем на 40 %.

Используя подход, предполагающий неравенство R_{ti} , были получены следующие 95 % доверительные интервалы для среднего $\bar{y}$:

$$L = 66,42 \% \text{ и } U = 142,32 \ \%.$$

Исходя из рассчитанных выше границ эквивалентности 87,50–114,3 %, видно, что используя данные спецификации небиволола, т. е. норму показателя «Растворение» – высвобождение не менее 75 % (Q) через 45 минут, профиль растворения между двумя сериями препарата небиволола не эквивалентный. Не смотря на визуальную схожесть графиков растворения (рисунок 1) и представленную оценку фактора сходимости f_2 .

Используя границы эквивалентности, как в исследованиях биоэквивалентности (с учетом различий не более 5 и 10 % между сравниваемыми лекарственными формами), видно, что полученные доверительные интервалы выходят за границы – соответственно 95,00–105,26 % и 90,00–111,11 %.

В таблице 6 представлены рассчитанные значения доверительных интервалов для каждой временной точки. Как видно все рассчитанные доверительные интервалы находятся вне установленных границ эквивалентности (см. таблицу 2). Что говорит о несходстве высвобождения действующего вещества из сравниваемых препаратов в каждой временной точке.

Метод на основе процедуры двух односторонних тестов (TOST)

Данный метод аналогичен методике, используемой в исследованиях биоэквивалентности, за исключением того, что оценивается отношение средних геометрических значений процентной доли высвободившегося действующего вещества из лекарственной формы исследуемого препарата к процентной доле высвободившегося действующего вещества из лекарственной формы референтного препарата, в каждый момент времени.

Таблица 6. Средние значения относительной скорости растворения и доверительные интервалы для каждой временной точки (по методу Chow и соавт.)

Table 6. Mean values of the relative dissolution rate and confidence intervals for each time point (according to the method of Chow et al.)

	Время Time		
	10 минут 10 minutes	15 минут 15 minutes	20 минут 20 minutes
$\hat{\gamma}_t$	103,03	104,81	105,29
L	81,59	42,70	32,06
U	186,11	147,22	136,58

Примечание. $\hat{\gamma}_t$ – средние значения относительной скорости растворения; L – нижняя граница 95 % доверительного интервала; U – верхняя граница 95 % доверительного интервала.

Note. $\hat{\gamma}_t$ – average values of the relative dissolution rate; L – the lower limit of the 95 % confidence interval; U – the upper limit of the 95 % confidence interval.

В основе метода по аналогии с исследованиями биоэквивалентности лежит статистическая гипотеза об отсутствии эквивалентности сравниваемых препаратов (имеются различия растворения) и альтернативная гипотеза о наличии эквивалентности (препараты имеют одинаковое растворение) в каждой временной точке. В случае если в результате расчетов доверительные интервалы окажутся вне установленного диапазона 95,00–105,26 % или 90,00–111,11 %, то принимается гипотеза об отсутствии эквивалентности сравниваемых препаратов.

Значения процентной доли высвободившегося действующего вещества из сравниваемых лекарственных форм были предварительно прологарифмированы (по основанию натурального логарифма), был выполнен двухвыборочный t -тест с различными дисперсиями (TOST Schuirmann, 1987) и рассчитаны 90 % доверительные интервалы в логарифмической шкале, которые затем были подвергнуты обратному преобразованию (Westlake, 1981) [8, 9]. Для расчетов использовано программное обеспечение Microsoft Excel (Office 365): выполнены двухвыборочные t -тесты с различными дисперсиями, рассчитаны доверительные интервалы. Результаты представлены в таблице 7.

Показано, что для каждой временной точки полученные 90 % доверительные интервалы не укладываются в установленные доверительные интервалы для 5 % различий и 10 % различий (95,00–105,26 % и 90,00–111,11 %).

Метод, основанный на оценке расстояния Махаланобиса и T^2 -теста

В научной литературе для препаратов с высоковариабельным высвобождением рекомендуется выполнять многомерный анализ. Наиболее простым методом оценки эквивалентности профилей растворения является тест, основанный на расстоянии Махаланобиса (Mahalanobis Distance Test), а именно T^2 -

тест [3]. Данный метод реализован в пакете «T2EQ» (версия 1.1 от 31.08.2016 г., автор: Thomas Hoffelder, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Germany), который разработан для программного обеспечения «R». Применяв функцию «T2EQ.dissolution.profiles.hoffelder(X, Y, alpha=0.05, print.result=TRUE)» данного пакета для данных, представленных в таблице 1, был получен результат, который говорит об эквивалентности профилей растворения (рисунок 2).

Таблица 7. Средние значения относительной скорости растворения и доверительные интервалы для каждой временной точки (по методу TOST Schuirmann, 1987, доверительные интервалы по методу Westlake, 1981)

Table 7. Average values of the relative dissolution rate and confidence intervals for each time point (according to the TOST method Schuirmann, 1987, confidence intervals according to the Westlake method, 1981)

	Время Time		
	10 минут 10 minutes	15 минут 15 minutes	20 мин 20 minutes
$\hat{\gamma}_t$	101,23	103,96	104,70
L	85,16	94,00	95,66
U	116,39	114,72	114,38

Примечание. $\hat{\gamma}_t$ – средние значения относительной скорости растворения; L – нижняя граница 95 % доверительного интервала; U – верхняя граница 95 % доверительного интервала.

Note. $\hat{\gamma}_t$ – average values of the relative dissolution rate; L – the lower limit of the 95 % confidence interval; U – the upper limit of the 95 % confidence interval.

Для расчета использовался следующий программный код:

```
«time_10 <- c(49.61, 56.7, 74.96, 83.06, 52.79, 75.11, 74.96,
92.47, 77.42, 68.18, 66.52, 42.51)
time_15 <- c(85.65, 75.73, 82.1, 92.45, 67.81, 86.58, 89.34,
96.99, 90.45, 76.2, 72.76, 66.4)
time_20 <- c(90.91, 88.54, 90.12, 94.67, 71.63, 94.62, 94.02,
98.53, 92.9, 79.94, 76.04, 73.48)
X <- data.frame(time_10, time_15, time_20, stringsAsFactors=
FALSE)
time_10 <- c(82.69, 66.53, 73.35, 70.87, 60.78, 69.44, 60.18,
59.17, 75.48, 65.39, 52.6, 67.93)
time_15 <- c(93.45, 77.06, 83.68, 92.51, 71.17, 76.27, 86.8,
65.35, 80.15, 72.67, 68.85, 77.06)
time_20 <- c(96.33, 86.67, 86.31, 96.1, 75.86, 80.43, 90.11,
70.1, 84.19, 76.34, 75.13, 80.92)
Y <- data.frame(time_10, time_15, time_20, stringsAsFactors=
FALSE)
T2EQ.dissolution.profiles.hoffelder(X, Y, alpha=0.05, print.
result=TRUE)»
```

Метод на основе процедуры бутстрэп для фактора сходимости f_2

Бутстрэп – это процедура многократной компьютерной генерации выборок методом Монте-Карло на базе имеющейся выборки. По данным некото-

```

*****

***** The T<U+00B2>-test for equivalence
*****
***** Variant for comparing highly variable dissolution profiles *****
***** ( see Hoffelder (2016) *****

*****

Summary statistics:

Sample size of REF sample:      12
Sample size of TEST sample:     12
Sample size of pooled sample:   24
Dimension (Nr. of time points): 3
REF Mean:                      67.8575 81.87167 87.11667
TEST Mean:                     67.03417 78.75167 83.2075
Empirical REF covariance matrix: 219.15 119.79 98.38 119.79 99.67 87.78 98.38 87.78 86.38
Empirical TEST covariance matrix: 66.99 51.8 45.63 51.8 80.03 72.77 45.63 72.77 69.07
Pooled empirical covariance matrix: 143.07 85.8 72.01 85.8 89.85 80.28 72.01 80.28 77.72
Estimated Mahalanobis distance: 0.3467864
Equivalence margin:            1.330479
Hotelling's T<U+00B2>:          2.080718
Noncentrality parameter:       7.982875
Significance level:             0.05
Teststatistic:                 0.6305207
Quantile of noncent. F-distribution: 0.8749803
Decision in favor (1) or against (0) equivalence/similarity of dissolution profiles: 1

Test result:

p-value of the T<U+00B2>-test for equivalence: p = 0.02648744

Equivalence comparison successful

*****

p.value testresult.num          testresult.text
1 0.02648744                   1 Equivalence comparison successful

```

Рисунок 2. Результаты T²-теста с применением пакета «T2EQ» для программного обеспечения «R»

Figure 2. Results of the T² test using the «T2EQ» package for the «R» software

рых авторов, расчет 90 % доверительного интервала для f_2 на основе методологии бутстрэпа был признан адекватным ведущими регуляторами в случаях, когда данные о растворении демонстрируют чрезмерную вариабельность [10]. В случае если 90 % доверительный интервал (ДИ) для f_2 на основе квантилей распределений повторных выборок (bias corrected and accelerated confidence interval, BCA) окажется полностью выше порогового значения 50 (т. е. и верхняя и нижняя границы ДИ будут выше указанного значения), можно судить об эквивалентности профилей кинетики растворения.

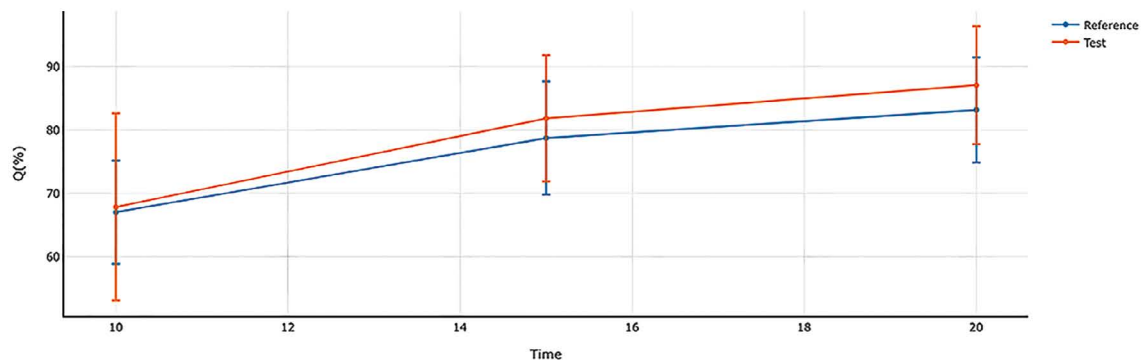
Результаты сравнения профилей растворения с применением данного метода продемонстрировали эквивалентность профилей растворения, т. к. доверительный интервал для ожидаемого f_2 составил 56,43–71,42, т. е. выше значения 50. Расчеты были получены с помощью бесплатного открытого программного обеспечения «bootf2BCA» (версия 1.2 от 05.05.2019 г., автор: Aleksander Mendyk, Chair of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics

Faculty of Pharmacy Jagiellonian University Medical College, Poland), реализованного в статистической среде «R» (рисунок 3).

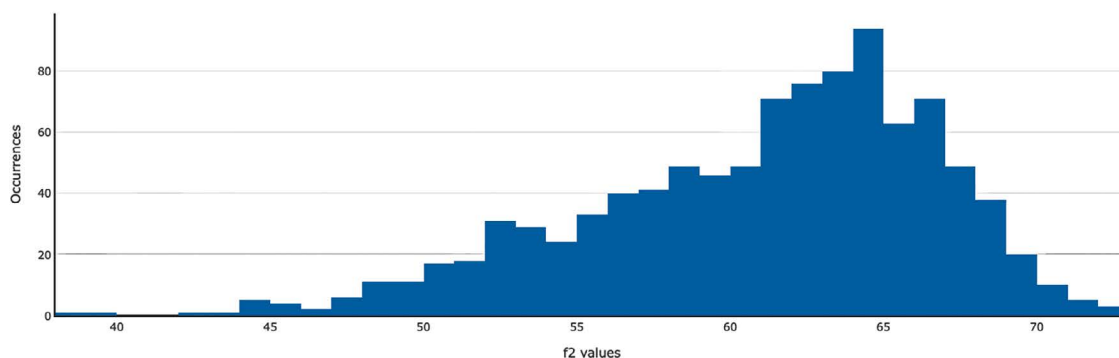
ОБСУЖДЕНИЕ

Из рассмотренного в статье примера видно, что графики высвобождения на рисунках 1 и 3 визуально демонстрируют близкие средние значения высвобождения небиволола из двух сравниваемых серий, но вариабельность одной серии значительно превосходит вариабельность второй серии. Фактор сходимости демонстрирует f_2 положительный результат, но не может использоваться в случае высокой вариабельности значений высвобождения (более 20 % в первой временной точке и 10 % в последующих).

Поэтому необходимо применять иные статистические и математические методы оценки. В настоящее время разными авторами предлагаются различные методы – модельно-зависимые и модельно-независимые.



A
A



B
B

Table of CI lower (L) and upper (U) limits

	L	U
normal	58.19	76.97
basic	59.96	78.29
percent	50.28	68.62
bca	56.43	71.42

- **L** - lower limit of the confidence interval
- **U** - upper limit of the confidence interval
- **normal** - normal approximation
- **basic** - basic bootstrap method
- **percent** - bootstrap percentile method
- **bca** - adjusted bootstrap percentile method

B
C

Рисунок 3. Результаты сравнения профилей растворения с помощью программного обеспечения «bootf2BCA».

A – профили растворения 2 серий небиволола; **Б** – гистограмма распределения значений фактора сходимости f_2 ; **В** – таблица рассчитанных 90 % доверительных интервалов; **Q** – доля высвободившегося действующего вещества; **CI** – доверительный интервал; **L** – нижняя границы; **U** – верхняя граница

Figure 3. Results of comparison of dissolution profiles using the «bootf2BCA» software.

A – dissolution profiles of 2 series of nebivolol; **B** – histogram of the distribution of values of the convergence factor f_2 ; **C** – table of calculated 90 % confidence intervals; **Q** – the fraction of the released active substance; **CI** – confidence interval; **L** – lower bounds; **U** is the upper limit

В данной работе мы рассмотрели несколько модельно-независимых методов оценки растворения лекарственных препаратов. Данные методики являются довольно простыми в применении, и не требуют

специализированного статистического программного обеспечения, легко реализуемы в Microsoft Excel и с помощью бесплатных общедоступных программных продуктов на основе статистической среды R.

Метод Chow (и соавторов) и метод на основе процедуры двух односторонних тестов (TOST) продемонстрировали отсутствие эквивалентности профилей растворения двух серий препарата небиволола, т. к. несмотря на сопоставимые средние значения, разброс данных получился большой и не укладывался в предустановленные доверительные интервалы. В связи с этим данные методы не следует использовать в случае высокой вариабельности растворения.

В настоящее время в научной литературе, а также ведущими регуляторами для высоковариабельных препаратов предлагается использовать многомерный метод анализа или методологию бутстрэпа для f_2 . Применение данных методов оценки позволило продемонстрировать сходство профилей кинетики растворения между сравниваемыми сериями небиволола, несмотря на значительную вариабельность растворения. Вместе с тем они также имеют минусы: T^2 -тест на основе расстояния Махаланобиса может демонстрировать ложноположительные результаты; методология бутстрэпа носит эмпирический характер и модели не имеют четкого нормативного подтверждения в регуляторных документах [6]. Однако методология бутстрэпа для f_2 признается Европейским регулятором более подходящей, чем T^2 -тест на основе расстояния Махаланобиса [6, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расчет фактора сходимости f_2 по-прежнему остается наиболее приемлемым методом сравнения профилей растворения. Несмотря на наличие недостатков, он в большинстве случаев остается наиболее простым и надежным методом сравнения.

Для препаратов, демонстрирующих высокую вариабельность значений высвобождения действующего вещества, не приемлемо использовать фактор сходимости в качестве критерия оценки профилей растворения. В таких случаях следует рассмотреть возможность применения методологии бутстрэпа f_2 .

Вместе с тем, какой бы метод, помимо фактора сходимости, не был использован для оценки профилей растворения, он должен быть обоснован, так как текущие руководства и нормативные документы регламентируют применение фактора сходимости f_2 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов А. Н., Ромодановский Д. П., Ниязов Р. Р., Горячев Д. В. Экспертные подходы к разработке и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведенных лекарственных препаратов в твердых лекарственных формах с немедленным высвобождением. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2014;2:3–8.
2. Chow S.-C., Fanny Y. c. K. Statistical comparison between dissolution profiles of drug products. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 1997;7(2):241–258. DOI: 10.1080/10543409708835184.
3. Hoffelder T. Equivalence analyses of dissolution profiles with the Mahalanobis distance. *Biometrical Journal*. 2019;61(5):1120–1137. DOI: 10.1002/bimj.201700257.
4. Abend A., Curran D., Kuiper J., Lu X., Li H., Hermans A., Kotwal P., Diaz D. A., Cohen M. J., Zhang L., Stippler E., Drazer G., Lin Y.,

- Raines K., Yu L., Coutant C. A., Grady H., Krämer J., Pope-Miksinski S., Suarez-Sharp S. Dissolution Testing in Drug Product Development: Workshop Summary Report. *The AAPS Journal*. 2019;21(2). DOI: 10.1208/s12248-018-0288-4.
5. Diaz D. A., Colgan S. T., Langer C. S., Bandi N. T., Likar M. D., Van Alstine L. Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations? *The AAPS Journal*. 2016;18(1):15–22. DOI: 10.1208/s12248-015-9830-9.
6. Шохин И. Е., Багаева Н. С., Малашенко Е. А., Кузина В. Н. Методы оценки эквивалентности профилей растворения: современный взгляд. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):145–150. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-145-150.
7. Suarez-Sharp S., Abend A., Hoffelder T., Leblond D., Delvadia P., Kovacs E., Diaz D. A. In Vitro Dissolution Profiles Similarity Assessment in Support of Drug Product Quality: What, How, When—Workshop Summary Report. *The AAPS Journal*. 2020;22(4):74. DOI: 10.1208/s12248-020-00458-9.
8. Schuirmann D. J. A comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and the Power Approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1987;15(6):657–680. DOI: 10.1007/BF01068419.
9. Kirkwood T. B. L., Westlake W. J. Bioequivalence Testing -- A Need to Rethink. *Biometrics*. 1981;37(3):589–594. DOI: 10.2307/2530573.
10. Noce L., Gwaza L., Mangas-Sanjuan V., Garcia-Arieta A. Comparison of free software platforms for the calculation of the 90% confidence interval of f_2 similarity factor by bootstrap analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;146:105259. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105259.

REFERENCES

1. Mironov A. N., Romodanovsky D. P., Niyazov R. R., Goryachev D. V. Expert approaches to developing and analysing the results of comparative dissolution kinetics testing for generic medicines in solid dosage forms. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medicinal Products*. 2014;2:3–8. (In Russ.)
2. Chow S.-C., Fanny Y. c. K. Statistical comparison between dissolution profiles of drug products. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 1997;7(2):241–258. DOI: 10.1080/10543409708835184.
3. Hoffelder T. Equivalence analyses of dissolution profiles with the Mahalanobis distance. *Biometrical Journal*. 2019;61(5):1120–1137. DOI: 10.1002/bimj.201700257.
4. Abend A., Curran D., Kuiper J., Lu X., Li H., Hermans A., Kotwal P., Diaz D. A., Cohen M. J., Zhang L., Stippler E., Drazer G., Lin Y., Raines K., Yu L., Coutant C. A., Grady H., Krämer J., Pope-Miksinski S., Suarez-Sharp S. Dissolution Testing in Drug Product Development: Workshop Summary Report. *The AAPS Journal*. 2019;21(2). DOI: 10.1208/s12248-018-0288-4.
5. Diaz D. A., Colgan S. T., Langer C. S., Bandi N. T., Likar M. D., Van Alstine L. Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations? *The AAPS Journal*. 2016;18(1):15–22. DOI: 10.1208/s12248-015-9830-9.
6. Shohin I. E., Bagaeva N. S., Malashenko E. A., Kuzina V. N. Method of Estimating the Equivalence of Dissolution Profiles: a Modern View. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):145–150. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-145-150.
7. Suarez-Sharp S., Abend A., Hoffelder T., Leblond D., Delvadia P., Kovacs E., Diaz D. A. In Vitro Dissolution Profiles Similarity Assessment in Support of Drug Product Quality: What, How, When—Workshop Summary Report. *The AAPS Journal*. 2020;22(4):74. DOI: 10.1208/s12248-020-00458-9.
8. Schuirmann D. J. A comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and the Power Approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1987;15(6):657–680. DOI: 10.1007/BF01068419.
9. Kirkwood T. B. L., Westlake W. J. Bioequivalence Testing -- A Need to Rethink. *Biometrics*. 1981;37(3):589–594. DOI: 10.2307/2530573.
10. Noce L., Gwaza L., Mangas-Sanjuan V., Garcia-Arieta A. Comparison of free software platforms for the calculation of the 90% confidence interval of f_2 similarity factor by bootstrap analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;146:105259. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105259.



Исправления к статье: «Разработка, валидация и применение методики количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа лекарственных средств и биологически активных добавок к пище»

И. Е. Шохин, Е. А. Малашенко, Ю. В. Медведев, М. Н. Богачук, С. А. Кулаков, М. А. Палеева

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(2):87–99. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99>. Статья опубликована: 25.05.2021.

Данные по объектам исследования БАД к пище «Детримакс Актив» и «Детримакс Бэби» были изъяты из статьи в связи с допущенной технической ошибкой, а именно, в связи с ошибочным завышением в статье размера отклонения фактического количества витамина D₃ от заявленного производителем в указанных образцах БАД к пище.

На странице 89 в разделе «Объекты исследования» были убраны упоминания о БАД к пище «Детримакс Актив» и «Детримакс Бэби».

Вместо: Для оценки количественного содержания холекальциферола разработанной методикой в реальных образцах были исследованы следующие лекарственные витаминные препараты: «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420); «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420). А также были исследованы витаминные БАД к пище: «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002); «Детримакс Бэби», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912004); «Детримакс Актив», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912041); «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141); «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220).

Исправлено на: Для оценки количественного содержания холекальциферола разработанной методикой в реальных образцах были исследованы следующие лекарственные витаминные препараты: «Аквадетрим» водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023, серия № 050420); «Аквадетрим» таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022, серия № 170420), а также витаминные БАД к пище: «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022, серия № 1913870002); «Детримакс 1000 МЕ» таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022, серия № WJ141); «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023, серия № 260220).

На странице 97 в разделе «Внутрилабораторная прецизионность» были убраны упоминания о БАД к пище «Детримакс Актив» и «Детримакс Бэби».

Вместо: Разработанная и валидированная методика была применена для анализа следующих лекарственных форм (лекарственные средства и биологически активные добавки):

Лекарственные средства:

1. «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420).
2. «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420).

Биологически активные добавки:

1. «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002).
2. «Детримакс Бэби», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912004).
3. «Детримакс Актив», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912041).
4. «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141).
5. «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220).

Исследование всех образцов было проведено в рамках одного аналитического цикла, что позволяет снизить внутрилабораторную вариабельность результатов исследования. Пригодность хроматографической системе соответствовала нормам. На хроматограммах как твердых лекарственных форм, так и жидких отсутство-

вали интерферирующие пики, мешающие анализу. Таким образом, результаты исследования могут быть признаны достоверными в рамках установленных валидационных характеристик.

Результаты анализа обобщены в таблице 8, нормированы по показателю содержания мкг/г для твердых лекарственных форм и мкг/мл для жидких лекарственных форм. Для жидких лекарственных форм производился с учетом поправки на плотность:

✓ «Аквадетрим», водный раствор – 1 г/мл.

✓ «Детримакс Бэби» – 0,9437 г/мл.

✓ «Детримакс Актив» – 0,9447 г/мл.

Погрешность метода рассчитана по формуле:

$$\Delta = 1,96 \cdot \text{СКО},$$

где СКО – среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности (СКО для жидких форм составило 2,9 %, СКО для сухих форм составило 5,8 %).

Соответственно, погрешность метода для жидких форм (водных растворов) составила $\pm 5,68$ %, для сухих лекарственных форм $\pm 11,37$ %.

Таблица 8. Результаты количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) в лекарственных формах (лекарственные средства и биологические активные добавки)

Table 8. Results of quantitative determination of vitamin D₃ (cholecalciferol) in dosage forms (drugs and dietary supplements)

Наименование препарата Drugname	Содержание D ₃ в препарате (заявленное) Vitamin D ₃ content in the drug (declared)	Содержание D ₃ в 1 г (1 мл) препарата (заявленное) Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (declared)	Содержание D ₃ в 1 г препарата (фактическое) Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (found)	Отклонение (факт/заявленное), % Deviation (found/ declared), %
«Ультра-Д» Ultra-D	25 мкг/табл. (масса табл. 425 мг) 25 µg/tablet (tablet weight 425 mg)	58,8 мкг/г 58.8 µg/g	52,6 мкг/г 52.6 µg/g	–10,5
«Детримакс Бэби» Detrimax Baby	5 мкг/1 каплю (200 МЕ/каплю) 5 µg/1 drop (200 IU/drop)	5 мкг/1 каплю, что соответствует 150 мкг/мл 5 µg/1 drop, equivalent to 150 µg/ml	87,7 мкг/мл 87.7 µg/ml	–41,5
«Детримакс Актив» Detrimax Active	12,5 мкг/1 каплю 12.5 µg/1 drop	12,5 мкг/1 каплю, что соответствует 375 мкг/мл 12.5 µg/1 drop, equivalent to 375 µg/ml	250,3 мкг/мл 250.3 µg/ml	–33,3
«Детримакс 1000 МЕ» Detrimax 1000 IU	25 мкг/табл. 25 µg/tablet	108,7 мкг/1 г 108.7 µg/1 g	106,1 мкг/г 106.1 µg/g	–2,4
«Детримакс 2000 МЕ» Detrimax 2000 IU	50 мкг/табл. 50 µg/tablet	208,3 мкг/1 г 208.3 µg/1 g	202,4 мкг/г 202.4 µg/g	–2,8
«Аквадетрим», водный раствор "Aquadetrim" aqueous solution	15 000 МЕ/мл; 1 капля (33,3 мкл) = 500 МЕ (12,5 мкг/33,3 мкл) 375 мкг/мл 15,000 IU / ml; 1 drop (33.3 µl) = 500 IU (12.5 µg/33.3 µl) 375 µg/ml	375 мкг/мл 375 µg/ml	370 мкг/мл 370 µg/ml	–1,3
«Аквадетрим», таблетки водорастворимые "Akvadetrim" water-soluble tablets	500 МЕ/табл. (12,5 мкг/табл.) 500 IU/tablet (12.5 µg/tablet)	156 мкг/1 г 156 µg/1 g	155 мкг/г 155 µg/g	–0,6

Исправлено на: Разработанная и валидированная методика была применена для анализа следующих лекарственных форм (лекарственные средства и биологические активные добавки):

Лекарственные средства:

1. Аквадетрим» водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023, серия № 050420).
2. «Аквадетрим» таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022, серия № 170420).

Биологически активные добавки:

1. «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022, серия № 1913870002).
2. «Детримакс 1000 МЕ» таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022, серия № WJ141)
3. «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023, серия № 260220)

Исследование всех образцов было проведено в рамках одного аналитического цикла, что позволяет снизить внутрилабораторную вариабельность результатов исследования. Пригодность хроматографической системы соответствовала нормам. На хроматограммах как твердых лекарственных форм, так и жидких отсутствовали интерферирующие пики, мешающие анализу. Таким образом, результаты исследования могут быть признаны достоверными в рамках установленных валидационных характеристик.

Результаты анализа обобщены в таблице 8, нормированы по показателю содержания мкг/г для твердых лекарственных форм и мкг/мл для жидких лекарственных форм. Для жидких лекарственных форм производился с учетом поправки на плотность («Аквадетрим» водный раствор – 1 г/мл)

Погрешность метода рассчитана по формуле:

$$\Delta = 1,96 \cdot \text{СКО},$$

где СКО – среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности (СКО для жидких форм составило 2,9 %, СКО для сухих форм составило 5,8 %). Соответственно, погрешность метода для жидких форм (водных растворов) составила $\pm 5,68$ %, для сухих лекарственных форм $\pm 11,37$ %.

Таблица 8. Результаты количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) в лекарственных формах (лекарственные средства и биологические активные добавки)

Table 8. Results of quantitative determination of vitamin D₃ (cholecalciferol) in dosage forms (drugs and dietary supplements)

Наименование препарата Drugname	Содержание D ₃ в препарате (заявленное) Vitamin D ₃ content in the drug (declared)	Содержание D ₃ в 1 г (1 мл) препарата (заявленное) Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (declared)	Содержание D ₃ в 1 г препарата (фактическое) Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (found)	Отклонение (факт/заявленное), % Deviation (found/ declared), %
«Ультра-Д» Ultra-D	25 мкг/табл. (масса табл. 425 мг) 25 µg/tablet (tablet weight 425 mg)	58,8 мкг/г 58.8 µg/g	52,6 мкг/г 52.6 µg/g	–10,5
«Детримакс 1000 МЕ» Detrimax 1000 IU	25 мкг/табл. 25 µg/tablet	108,7 мкг/1 г 108.7 µg/1 g	106,1 мкг/г 106.1 µg/g	–2,4
«Детримакс 2000 МЕ» Detrimax 2000 IU	50 мкг/табл. 50 µg/tablet	208,3 мкг/1 г 208.3 µg/1 g	202,4 мкг/г 202.4 µg/g	–2,8
«Аквадетрим», водный раствор "Aquadetrim" aqueous solution	15 000 МЕ/мл; 1 капля (33,3 мкл) = = 500 МЕ (12,5 мкг/33,3 мкл) 375 мкг/мл 15,000 IU / ml; 1 drop (33.3 µl) = = 500 IU (12.5 µg/33.3 µl) 375 µg/ml	375 мкг/мл 375 µg/ml	370 мкг/мл 370 µg/ml	–1,3
«Аквадетрим», таблетки водорастворимые "Akvadetrim" water-soluble tablets	500 МЕ/табл. (12,5 мкг/табл.) 500 IU/tablet (12.5 µg/tablet)	156 мкг/1 г 156 µg/1 g	155 мкг/г 155 µg/g	–0,6

На страницах 97–98 в разделе «ЗАКЛЮЧЕНИЕ» были убраны упоминания о БАД к пище «Детримакс Актив» и «Детримакс Бэби» и изменён вывод.

Вместо: Разработана методика определения показателя «Содержание витамина D₃ (холекальциферола)» в витаминных лекарственных формах методом ВЭЖХ. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность; правильность; линейность; диапазон применения; прецизионность. Показано, что результаты валидации удовлетворительны по всем указанным критериям. Диапазон применения методики 38– 9,5 мкг/мл.

Результаты валидации методики и исследования реальных образцов показали, что данная методика может быть использована для определения витамина D₃ в витаминных лекарственных препаратах на основе водорастворимых субстанций витамина D₃, в виде водных растворов и растворов триглицеридов жирных кислот.

По результатам количественного определения было установлено, что:

1. Для лекарственного средства «Аквадетрим» водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023, серия № 050420) фактическое содержание витамина D₃ составило 370 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –1,3 %.

2. Для лекарственного средства «Аквадетрим» таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022, серия № 170420) фактическое содержание витамина D₃ составило 155 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –0,6 %.
3. Для биологически активной добавки «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022, серия №1913870002) фактическое содержание витамина D₃ составило 58,8 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –10,5 %.
4. Для биологически активной добавки «Детримакс Бэби», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022, серия № 1912004) фактическое содержание витамина D₃ составило 93 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –41,5 %.
5. Для биологически активной добавки «Детримакс Актив», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022, серия № 1912041) фактическое содержание витамина D₃ составило 265 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –33,3 %.
6. Для биологически активной добавки «Детримакс 1000 МЕ» таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022, серия № WJ141) фактическое содержание витамина D₃ составило 106,1 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –2,4 %.
7. Для биологически активной добавки «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023, серия №260220) фактическое содержание витамина D₃ составило 202,4 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –2,6 %.

Следует отметить, что в витаминных БАД к пище содержание витамина D₃ подвержено большему разбросу от заявленного. Жидкие БАД для пищи на основе триглицеридов жирных кислот требуют тщательного контроля используемого сырья (контроль перекисного и кислотного числа), поскольку витамин D₃ не стабилен на свету и в среде, богатой кислородом.

Исправлено на: Разработана методика определения показателя «Содержание витамина D₃ (холекальциферола)» в витаминных лекарственных формах методом ВЭЖХ. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность. Показано, что результаты валидации удовлетворительны по всем указанным критериям. Диапазон применения методики 9,5–38 мкг/мл.

Результаты валидации методики и исследования реальных образцов показали, что данная методика может быть использована для определения витамина D₃ в витаминных лекарственных препаратах на основе водорастворимых субстанций витамина D₃, в виде водных растворов и растворов триглицеридов жирных кислот.

По результатам количественного определения было установлено, что:

1. Для лекарственного средства «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420), фактическое содержание витамина D₃ составило 370 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –1,3 %.
2. Для лекарственного средства «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420), фактическое содержание витамина D₃ составило 155 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –0,6 %.
3. Для биологически активной добавки «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002), фактическое содержание витамина D₃ составило 58,8 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –10,5 %.
4. Для биологически активной добавки «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141), фактическое содержание витамина D₃ составило 106,1 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –2,4 %.
5. Для биологически активной добавки «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220), фактическое содержание витамина D₃ составило 202,4 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –2,8 %.

В результате проведенных исследований было показано, что для определения витамина D₃, используемого в виде водорастворимой субстанции, в лекарственных препаратах и БАД к пище возможно использование методик без проведения стадии омыления. Это дает ощутимые преимущества, так как позволяет избежать потерь действующего вещества в процессе многостадийной подготовки проб, ведь витамин D₃ нестабилен на свету и в среде, богатой кислородом.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

Erratum: "HPLC-UV Method Development and Validation for Vitamin D₃ (Cholecalciferol) Quantitation in Drugs and Dietary Supplements"

Igor E. Shohin, Evgeniya A. Malashenko, Yuri V. Medvedev, Maria N. Bogachuk,
Stanislav A. Kulakov, Maria A. Paleeva

Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration. 2021;10(2):87–99. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99>. Published: 25.05.2021.

The data on the objects of study of dietary supplements for food "Detrimax Active" and "Detrimax Baby" were removed from the article due to a technical error, namely, the wrong overestimation of the deviation of the actual amount of vitamin D₃ in the article from the manufacturer declared in the indicated samples of dietary supplements to food.

On page 89 in the section "Objects of Research", mentions of dietary supplements to food "Detrimax Active" and "Detrimax Baby" were removed.

Instead: For the assay of cholecalciferol with developed method in real samples, the following vitamin drug products: "Aquadetrim", aqueous solution 10 ml by JSC "Medana Pharma" (valid up to 04.2023, batch № 050420); "Aquadetrim", water soluble tablets by JSC "Akrikhin" (valid up to 04.2022, batch № 170420). Vitamin dietary supplements were also investigated: "Ultra-D", chewable tablets by "Pharmia Oy" (valid up to 05.12.2022, batch № 1913870002); "Detrimax Baby", 30 ml by "Curtis Health Caps Sp.z.o.o" (valid up to 11.2022, batch № 1912004); "Detrimax Active", 30 ml by "Curtis Health Caps Sp.z.o.o" (valid up to 11.2022, batch № 1912041); "Detrimax 1000 IU", tablets by "Eagle Nutritionals Inc" (valid up to 02.2022, batch № WJ141); "Detrimax 2000 ME", tablets by "Grokam JBL Sp.z.o.o" (valid up to 11.02.2023, batch № 260220).

Corrected to: For the assay of cholecalciferol with developed method in real samples, the following vitamin drug products: "Aquadetrim", aqueous solution 10 ml by JSC "Medana Pharma" (valid up to 04.2023, batch № 050420); "Aquadetrim", water soluble tablets by JSC "Akrikhin" (valid up to 04.2022, batch № 170420). Vitamin dietary supplements were also investigated: "Ultra-D", chewable tablets by "Pharmia Oy" (valid up to 05.12.2022, batch № 1913870002); "Detrimax 1000 IU", tablets by "Eagle Nutritionals Inc" (valid up to 02.2022, batch № WJ141); "Detrimax 2000 ME", tablets by "Grokam JBL Sp.z.o.o" (valid up to 11.02.2023, batch № 260220).

On page 97 in the section "Intralaboratory precision", mentions of dietary supplements for food "Detrimax Active" and "Detrimax Baby" were removed:

Instead: The developed and validated method was used for the analysis of the following dosage forms (drug products and biologically active dietary supplements): Drug products:

1. "Aquadetrim", aqueous solution 10 ml by JSC "Medana Pharma" (valid up to 04.2023, batch № 050420).
2. "Aquadetrim", water soluble tablets by JSC "Akrikhin" (valid up to 04.2022, batch № 170420).

Biologically active dietary supplements:

1. "Ultra-D" chewable tablets "Pharmia Oy" (valid up to 05.12.2022, batch № 1913870002).
2. "Detrimax Baby", 30 ml, by "Curtis Health Caps Sp.z.o.o" (valid up to 11.2022, batch № 1912004).
3. "Detrimax Active", 30 ml by "Curtis Health Caps Sp.z.o.o" (valid up to 11.2022, batch № 1912041).
4. "Detrimax 1000 IU", tablets by "Eagle Nutritionals Inc", (valid up to 02.2022, batch № WJ141).
5. "Detrimax 2000 IU" tablets by "Grocama JBL Sp.z.o.o" (valid up to 11.02.2023, batch № 260220).

All samples were tested within one analytical cycle which allowed to reduce intralaboratory variability of the investigation results. System suitability met the normal values. Chromatograms of both solid and liquid dosage forms did not show peaks interfering with the analysis. Therefore the test results may be considered significant within the established validation characteristics.

The analysis results were summarized in table 8, standardized by parameter contents µg/g for solid dosage forms and µg/ml for liquid dosage forms. The analysis for liquid dosage forms was performed as corrected by density:

- ✓ "Aquadetrim", aqueous solution – 1 g/ml.
- ✓ "Detrimax Baby" – 0.9437 g/ml.
- ✓ "Detrimax Active" – 0.9447 g/ml.

The method error was calculated by equation:

$$\Delta = 1.96 \cdot \text{CKO},$$

where MSD – mean square deviation of intralaboratory precision (MSD for liquid forms was 2.9 %, MSD for dry forms was 5.8 %).

The method error for liquid forms (aqueous solutions) was ±5.68 %, for dry dosage forms ±11.37 %, respectively.

Table 8. Results of quantitative determination of vitamin D₃ (cholecalciferol) in dosage forms (drugs and dietary supplements)

Drugname	Vitamin D ₃ content in the drug (declared)	Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (declared)	Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (found)	Deviation (found/ declared), %
Ultra-D	25 µg/tablet (tablet weight 425 mg)	58.8 µg/g	52.6 µg/g	-10,5
Detrimax Baby	5 µg/1 drop (200 IU/drop)	5 µg/1 drop, equivalent to 150 µg/ml	87.7 µg/ml	-41,5
Detrimax Active	12.5 µg/1 drop	12.5 µg/1 drop, equivalent to 375 µg/ml	250.3 µg/ml	-33,3
Detrimax 1000 IU	25 µg/tablet	108.7 µg/1 g	106.1 µg/g	-2,4
Detrimax 2000 IU	50 µg/tablet	208.3 µg/1 g	202.4 µg/g	-2,8
"Aquadetrim" aqueous solution	15,000 IU / ml; 1 drop (33.3 µl) = 500 IU (12.5 µg/33.3 µl) 375 µg/ml	375 µg/ml	370 µg/ml	-1,3
"Akvadetrim" water-soluble tablets	500 IU/tablet (12.5 µg/tablet)	156 µg/1 g	155 µg/g	-0,6

Corrected to: The developed and validated method was used for the analysis of the following dosage forms (drug products and biologically active dietary supplements): Drug products:

1. "Aquadetrim", aqueous solution 10 ml by JSC "Medana Pharma" (valid up to 04.2023, batch № 050420).
2. "Aquadetrim", water soluble tablets by JSC "Akrikhin" (valid up to 04.2022, batch № 170420).

Biologically active dietary supplements:

1. "Ultra-D" chewable tablets "Pharmia Oy" (valid up to 05.12.2022, batch № 1913870002).
2. "Detrimax 1000 IU", tablets by "Eagle Nutritionals Inc", (valid up to 02.2022, batch № WJ141).
3. "Detrimax 2000 IU" tablets by "Grocama JBL Sp.z.o.o" (valid up to 11.02.2023, batch № 260220).

All samples were tested within one analytical cycle which allowed to reduce intralaboratory variability of the investigation results. System suitability met the normal values. Chromatograms of both solid and liquid dosage forms did not show peaks interfering with the analysis. Therefore the test results may be considered significant within the established validation characteristics.

The analysis results were summarized in table 8, standardized by parameter contents µg/g for solid dosage forms and µg/ml for liquid dosage forms. The analysis for liquid dosage forms was performed as corrected by density ("Aquadetrim", aqueous solution – 1 g/ml).

The method error was calculated by equation:

$$\Delta = 1.96 \cdot \text{CKO},$$

where MSD – mean square deviation of intralaboratory precision (MSD for liquid forms was 2.9 %, MSD for dry forms was 5.8 %).

The method error for liquid forms (aqueous solutions) was ±5.68 %, for dry dosage forms ±11.37 %, respectively.

Table 8. Results of quantitative determination of vitamin D₃ (cholecalciferol) in dosage forms (drugs and dietary supplements)

Drugname	Vitamin D ₃ content in the drug (declared)	Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (declared)	Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (found)	Deviation (found/ declared), %
Ultra-D	25 µg/tablet (tablet weight 425 mg)	58.8 µg/g	52.6 µg/g	-10,5
Detrimax 1000 IU	25 µg/tablet	108.7 µg/1 g	106.1 µg/g	-2,4
Detrimax 2000 IU	50 µg/tablet	208.3 µg/1 g	202.4 µg/g	-2,8
"Aquadetrim" aqueous solution	15,000 IU / ml; 1 drop (33.3 µl) = 500 IU (12.5 µg/33.3 µl) 375 µg/ml	375 µg/ml	370 µg/ml	-1,3
"Akvadetrim" water-soluble tablets	500 IU/tablet (12.5 µg/tablet)	156 µg/1 g	155 µg/g	-0,6

On pages 97–98, in the "CONCLUSION" section, mentions of dietary supplements to food "Detrimax Active" and "Detrimax Baby" were removed and the conclusion was changed.

Instead: The method for determination of parameter "Contents of vitamin D₃ (cholecalciferol)" in vitamin dosage forms with HPLC was developed. The method was validated by the following validation parameters: specificity, accuracy, linearity, range, precision. It was shown that the validation results are satisfactory by all specified criteria. The range of the method is 9.5–38 µg/ml.

The results of the method validation and investigation of actual samples may be used for determination of vitamin D₃ in vitamin products based on water soluble substances of vitamin D₃, as aqueous solutions and solutions of fatty acid triglycerides.

Based on the assay results, it was established that:

1. Actual contents of vitamin D₃ for product "Aquadetrim", aqueous solution 10 ml by JSC "Medana Pharma" (valid up to 04.2023, batch № 050420), Actual contents of the vitamin was 370 µg/ml, and the deviation of the actual contents from the label claim was –1.3 %.
2. Actual contents of vitamin D₃ for "Aquadetrim", water soluble tablets by JSC "Akrikhin" (valid up to 04.2022, batch № 170420) was 155 мкг/г, and the deviation of the actual contents from the label claim was –0.6 %.
3. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Ultra-D", chewable tablets by "Pharmia Oy" (valid up to 05.12.2022, batch № 1913870002) 58,8 µg/g, and the deviation of the actual contents from the label claim –10,5 %.
4. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Detrimax Baby", 30 ml, by "Curtis Health Caps Sp.z.o.o" (valid up to 11.2022, batch № 1912004), 93 µg/ml, and the deviation of the 93 µg/ml, and the deviation of the actual contents from the label claim –41.5%.
5. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Detrimax Active", 30 ml by "Curtis Health Caps Sp.z.o.o" (valid up to 11.2022, batch № 1912041) was 265 µg/ml, and the deviation of the actual contents from the label claim –33.3 %.
6. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Detrimax 1000 IU", tablets by "Eagle Nutritionals Inc" (valid up to 02.2022, batch № WJ141) was 106.1 µg/g, and the deviation of the actual contents from the label claim –2.4 %.
7. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Detrimax 2000 IU", tablets, by "Grocama JBL Sp.z.o.o." (valid up to 11.02.2023, batch № 260220) was 202.4 µg/g, and the deviation of the actual contents from the label claim –2.8 %.

It should be established that contents of vitamin D₃ in vitamin dietary supplements tend to a greater dispersion from the declared one. Liquid dietary supplements based on fatty acid triglycerides require comprehensive control of raw materials used (control of peroxide and acid value) as vitamin D₃ is unstable at the light and oxygen-rich medium.

Corrected to: The method for determination of parameter "Contents of vitamin D₃ (cholecalciferol)" in vitamin dosage forms with HPLC was developed. The method was validated by the following validation parameters: specificity, accuracy, linearity, range, precision. It was shown that the validation results are satisfactory by all specified criteria. The range of the method is 9.5–38 µg/ml.

The results of the method validation and investigation of actual samples may be used for determination of vitamin D₃ in vitamin products based on water soluble substances of vitamin D₃ and as aqueous solutions.

Based on the assay results, it was established that:

1. Actual contents of vitamin D₃ for product "Aquadetrim", aqueous solution 10 ml by JSC "Medana Pharma" (valid up to 04.2023, batch № 050420), Actual contents of the vitamin was 370 µg/ml, and the deviation of the actual contents from the label claim was –1.3 %.
2. Actual contents of vitamin D₃ for "Aquadetrim", water soluble tablets by JSC "Akrikhin" (valid up to 04.2022, batch № 170420) was 155 мкг/г, and the deviation of the actual contents from the label claim was –0.6 %.
3. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Ultra-D", chewable tablets by "Pharmia Oy" (valid up to 05.12.2022, batch № 1913870002) 58,8 µg/g, and the deviation of the actual contents from the label claim –10,5 %.
4. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Detrimax 1000 IU", tablets by "Eagle Nutritionals Inc" (valid up to 02.2022, batch № WJ141) was 106.1 µg/g, and the deviation of the actual contents from the label claim –2.4 %.
5. Actual contents of vitamin D₃ for biologically active dietary supplement "Detrimax 2000 IU", tablets, by "Grocama JBL Sp.z.o.o." (valid up to 11.02.2023, batch № 260220) was 202.4 µg/g, and the deviation of the actual contents from the label claim –2.8 %.

As a result of the studies, it was shown that for the determination of vitamin D₃, used in the form of a water-soluble substance, in medicines and dietary supplements for food, it is possible to use methods without carrying out the saponification stage. This provides tangible benefits, since allows you to avoid the loss of the active substance in the process of multi-stage sample preparation, because vitamin D₃ is unstable in the light and in an environment rich in oxygen.

The online version of the article on the journal's website has been updated.



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, алергизирующее и иммуотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

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

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикации 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 науке:

- 14.04.01 – Технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (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 выборок 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 отдает приоритет аспирантским и докторским работам, 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 несоответствия 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

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
6. ORCID всех авторов статьи.

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.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

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).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

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.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

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). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя 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-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдронол 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 необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производителя, 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-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, 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: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – 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 вариабельности) 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, написание 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 ал-

фавиту. 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.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации*, затем ставится знак = и дается английское название журнала (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

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. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

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.

5. Литература/References

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. Недопустимо 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

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (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 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

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.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya 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 предоставляемых 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. Внутрисигнатурные 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.

Новые системы растворения на базе DT 950 и ПО Disso.NET

Демонстрация
по запросу на
sales@erweka.ru

Подробнее об DT 950 на
сайте www.erweka.ru

NEW

ДОСТУПНЫЕ СИСТЕМЫ НА БАЗЕ ПО DISSO.NET

- Офлайн система
- Онлайн система
- Он/офлайн система с UV-Vis
- Он/офлайн система с HPLC



Аналитические
методы

100%

Соответствие
USP/EP/ГФ РФ



Полный контроль
ПО Disso.NET

ООО „ЭРВЕКА“

115114 Москва
Летниковская 16-103

E-Mail: sales@erweka.ru
Тел.: +7 499 110 90 60

ERWEKA

ТЕСТИРОВАНИЕ РАСТВОРЕНИЯ

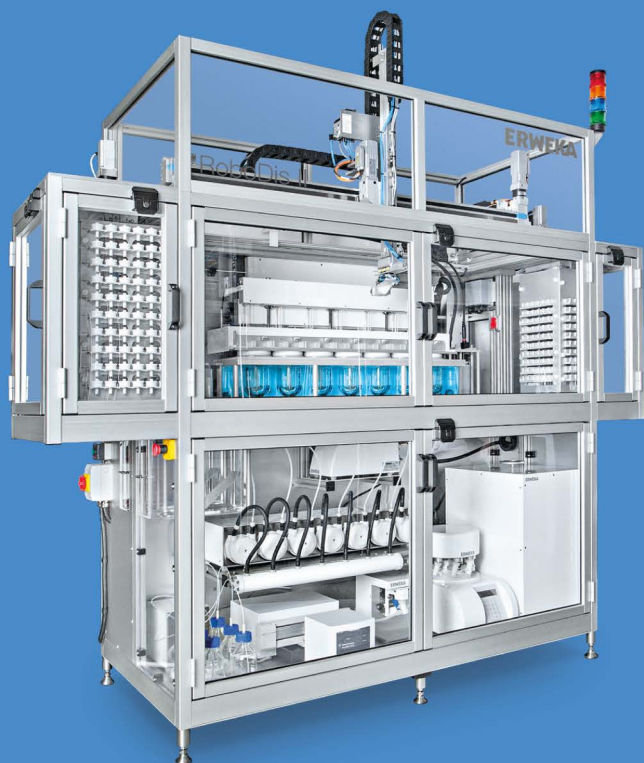
DT 950 Series

ЦИФРОВОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ
РАСТВОРЕНИЯ



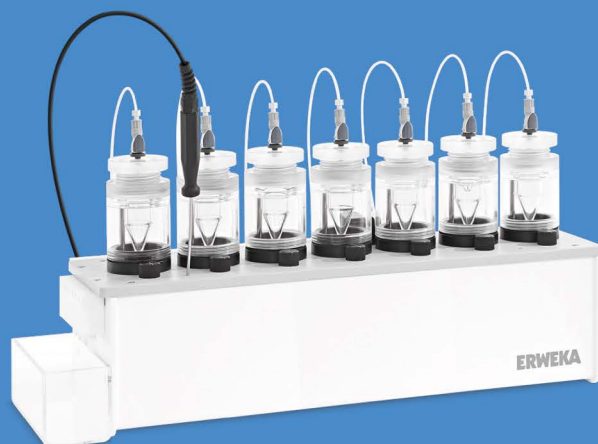
RoboDis II+

ПОЛНОСТЬЮ
АВТОМАТИЧЕСКОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ



USP 4 DFZ II

ТЕСТИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ
ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА



ООО „ЭРВЕКА“

115114 Москва
Летниковская 16-103

E-Mail: sales@erweka.ru
Тел.: +7 499 110 90 60

ERWEKA

Универсальный детектор заряженных аэрозолей **Corona Veo (Thermo Scientific)**



- ✓ Подходит к системе ВЭЖХ/УВЭЖХ любого производителя.
- ✓ Для разработчиков и производителей вакцин и фармпрепаратов.
- ✓ Мгновенная детализация состава, стабильности, примесей и продуктов разложения.
- ✓ Создан для определения безхромовых аналитов



Узнай больше на www.avrora-analyt.ru и thermo@avrora-lab.com
Официальный дистрибьютор Thermo Scientific в России —
компания «АВРОРА»