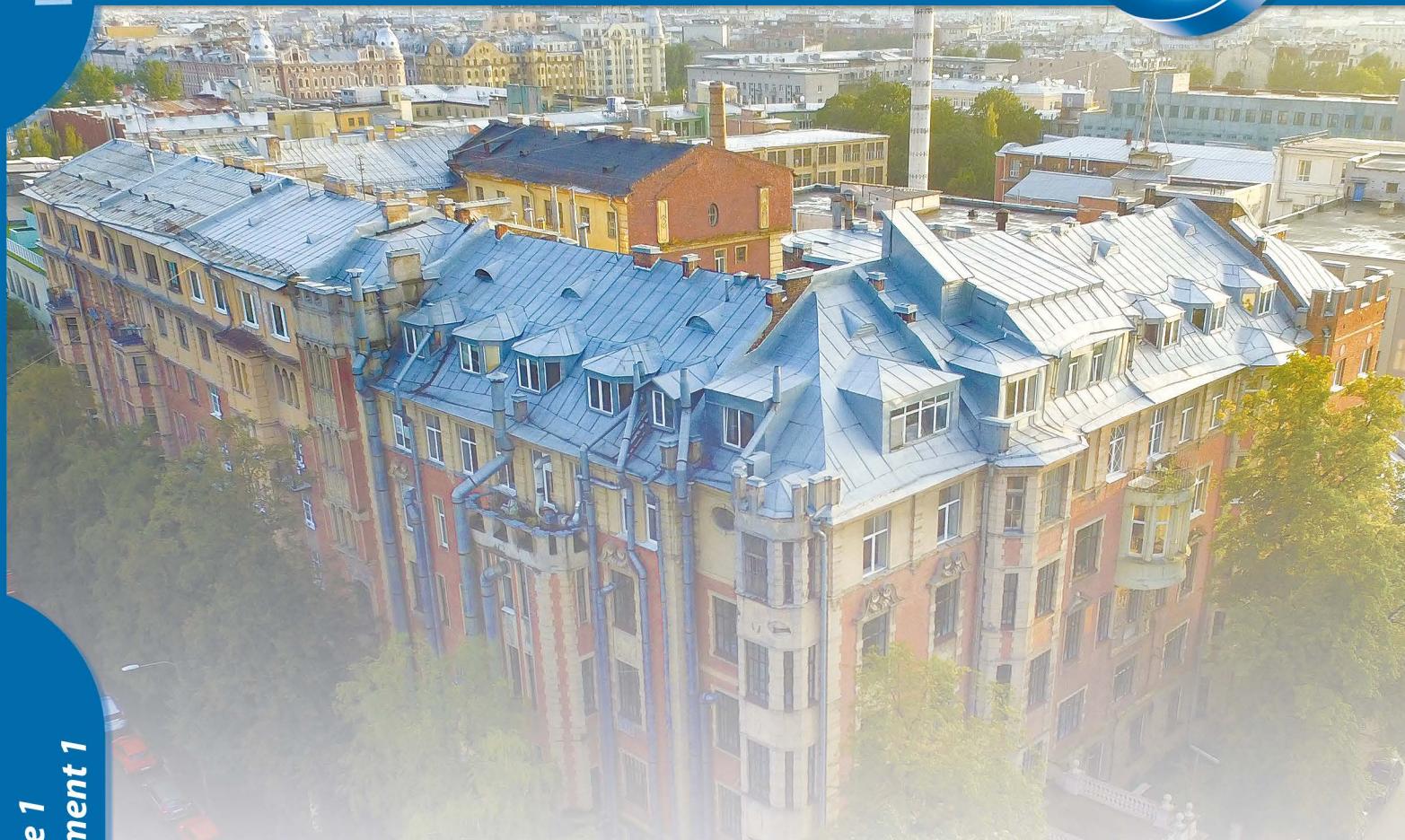


РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ
BAC Scopus®



ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП
«Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России»



Saint-Petersburg State Chemical
and Pharmaceutical University

10th Anniversary Special Issue Center for Collective Use
"Analytical Center of SPCPU "



Центр экспериментальной фармакологии (ЦЭФ)

Центр экспериментальной фармакологии (ЦЭФ) – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий исследования в области безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики инновационных, оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов.

Основные виды деятельности центра:

- Проведение доклинических исследований различных видов общей и специфической токсичности, фармакологической безопасности.
- Осуществление научно-исследовательской деятельности в области доклинических исследований.
- Образовательная деятельность, повышение квалификации.
- Осуществление подготовки модулей регистрационного dossier лекарственных препаратов.

Область сертификации:

- Научно-исследовательская работа.
- Исследования острой токсичности, иммунной токсичности и аллергенности.



Контакты:

Начальник ЦЭФ – канд.биол.наук **Дмитрий Юрьевич Ивкин**
Тел.: 499-39-00 (доб. 3319); e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ISSN 2305-2066 (Print)
ISSN 2658-5049 (Online)



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2021. Том 10, № 4,
приложение 1

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП
«Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России»

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2021. Volume 10, No. 4,
supplement 1

10th Anniversary Special Issue Center for Collective Use
"Analytical Center of SPCPU"

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 GxP-окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

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, Рединг, 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

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

Вартанянц 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

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

Мирошниченко 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

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

Сысусев Б. Б., доц., д. фарм. н., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Ташицкий 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	<p>Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3</p> <p>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</p> <p>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2</p>
Учредители онлайн версии	<p>Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3</p>
Издатель	<p>Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3</p>
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	<p>Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. www.pharmjournal.ru e-mail e-mail: info@pharmjournal.ru</p>
Адрес типографии	<p>ООО «МАКС ПРЕСС» Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103</p>
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

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. Vartaniants, Prof., Cand. of Sci., Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany

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

Dmitriy A. Gusearov, 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. Kulinch, Cand. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

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

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

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

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

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, Moskovskiy 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 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
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Выделения формононетин-7-О-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (<i>Ononis arvensis</i> L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов	
А. М. Богоутдинова, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, А. А. Орлова, М. Ю. Гончаров, В. С. Шпакова, Н. Т. Фармanova, Д. Х. Нуруллаева, А. Т. Шарипов, С. П. Гамбaryan, М. Н. Повыдыш	14
Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца	
А. А. Жигалина, В. Г. Дударев, В. В. Тихонова, О. Ю. Стрелова	20
Лекарственная флора Среднего Урала – перспективный источник получения лекарственных средств	
А. Ю. Турышев, В. Д. Белоногова, А. А. Орлова, К. О. Сидоров, А. Ю. Скорнякова	32
Фармацевтическая технология	
Разработка технологии и состава средства для полости рта на основе фитосубстанций	
О. Н. Абросимова, Н. С. Пивоварова, М. А. Буракова, Т. С. Шебитченко	37
Изучение технологических свойств вспомогательных веществ при разработке состава орально диспергируемых таблеток	
И. Д. Касымов, А. В. Басевич	46
Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с применением метода SeDeM	
Ю. М. Коцур, Ю. М. Ладутько, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк	54
Экспериментальное обоснование состава желатиновой массы для получения капсул с эфирными маслами	
Е. И. Молохова, Е. И. Пономарева, Ю. В. Сорокина, И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина, В. В. Новикова, А. Л. Голованенко, Е. С. Березина, Ю. М. Ладутько	63
Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов	
У. В. Ногаева, Ю. М. Коцур, Е. В. Флисюк, Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко, И. А. Титович, И. А. Наркевич, В. Г. Антонов	69
Печать таблеток рамиприла методом послойного наплавления	
О. А. Терентьева, К. А. Гусев, В. В. Тихонова, Д. Н. Маймистов, Г. А. Шандрюк, Е. В. Флисюк	79
Разработка лекарственной формы мафедина в виде лиофилизата для парентерального введения	
О. А. Терентьева, В. А. Вайнштейн, В. В. Тихонова, А. К. Уэйли, М. А. Трофимов, В. А. Приходько, Л. В. Шигарова	88
Методы анализа лекарственных средств	
Сравнительный ГХ-МС анализ состава метаболитов надземной и подземной части сабельника болотного (<i>Comarum palustre</i> L.)	
Й. Стругар, А. А. Орлова, М. Н. Повыдыш	95
Определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного травы	
М. В. Ароян, Ю. Э. Генералова, И. И. Тернинко, И. Е. Каухова, Е. К. Новикова	104
Разработка и изучение стабильности растворов коменовой кислоты	
Т. А. Биткина, А. В. Басевич	108
Установление количественного содержания 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропирамидин-4-олята натрия в стандартном образце	
Е. В. Кубаева, Д. А. Колесник, П. О. Левшукова, И. И. Тернинко, И. П. Яковлев, Е. В. Федорова	115

Идентификация и количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой (<i>Orthilia secunda</i>)	
А. В. Лёзина, И. И. Тернинко, М. В.	122
Использование метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии для обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной <i>Empetrum nigrum</i> L.	
А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, В. Г. Лужанин, Е. В. Жохова	129
Сравнительный фитохимический анализ образцов надземной части <i>Empetrum nigrum</i> L., собранных в различных регионах РФ, как перспективного источника фармакологически активных вторичных метаболитов	
А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, Е. В. Жохова, Е. А. Безверхняя, В. Г. Лужанин	138
Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с пролонгированным высвобождением	
Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур, И. А. Наркевич, И. Е. Смехова, Д. Ю. Ивкин	146
Доклинические и клинические исследования	
Модификация модели неалкогольной жировой болезни печени у крыс при сочетании гиперкалорийной диеты и гиподинамии	
А. В. Бунят, О. М. Спасенкова, В. Е. Карев, А. В. Караваева, Д. Ю. Ивкин, А. Н. Куликов, С. В. Оковитый, Н. В. Кириллова	155
Влияние клатратного комплекса селенопирана и β-циклогексстраина на скорость заживления условно асептической полнослойной плоскостной раны у крыс	
Д. В. Заяц, О. В. Буюклинская, Ю. Р. Федотова, Н. С. Феленко	166
Сравнительная эффективность трансдермальных форм для терапии алопеции	
У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, Г. А. Плиско, Е. В. Флисюк, В. Е. Ковансков, Ю. Г. Штырлин, К. О. Сидоров	171
Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс	
В. А. Приходько, А. В. Кан, Ю. И. Сысоев, И. А. Титович, Н. А. Анисимова, С. В. Оковитый	179
Лабораторная диагностика немедикаментозного применения тропикамида	
О. Ю. Стрелова, Ю. В. Слустовская, А. Н. Гребенюк	188
Оценка влияния минерального комплекса рутина на степень выраженности противодиабетической активности	
В. И. Топоркова, Е. В. Вишняков, К. О. Сидоров, И. И. Тернинко, Д. Ю. Ивкин	197
Изменения в профиле жирных кислот печени крыс при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите	
Е. Б. Шустов, А. В. Бунят, А. Г. Платонова, О. М. Спасенкова, Н. В. Кириллова, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый, А. Н. Кимаев	206

CONTENTS

Introduction	10
Research and development of new drug products	
Isolation of Formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the Grass of <i>Ononis arvensis</i> L. and the Assessment of its Effect on Induced Platelet Activation	
Alina M. Bogoutdinova, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Ponkratova, Anastasia A. Orlova, Michail Yu. Goncharov, Valentina S. Shpakova, Nodira T. Faranova, Dilobar Kh. Nurullaeva, Avez T. Sharipov, Stepan P. Gambaryan, Maria N. Povydysh	14
Development of Genistein Synthesis for Use as a Certified Reference Material	
Anna A. Zhigalina, Vladimir G. Dudarev, Viktoria V. Tikhonova, Olga Yu. Strelova	20
Medicinal Flora of the Middle Urals – a Prospective Source of Obtaining Medicines	
Aleksey Yu. Turyshev, Valentina D. Belonogova, Anastasia A. Orlova, Kirill O. Sidorov, Anna Yu. Skornyakova	32
Pharmaceutical Technology	
Development of Technology and Composition of the Medicinal Product for Oral Cavity Based on Phytochemicals	
Olesya N. Abrosimova, Nadezhda S. Pivovarova, Marina A. Burakova, Tatyana S. Shebitchenko	37
Study of the Technological Properties of Excipients in the Development of the Composition of Orally Dispersible Tablets	
Ilya D. Kasymov, Anna V. Basevich	46
Prediction of the Composition of Prolonged Release Tablets Based on 4,4'-(propandiamido)sodium Dibenoate Using the SeDeM Method	
Julia M. Kotsur, Julia M. Ladytko, Igor A. Narkevich, Elena V. Flisyuk	54
Experimental Substantiation of the Composition of Gelatin Mass for Obtaining Capsules with Essential Oils	
Elena I. Molokhova, Ekaterina I. Ponomareva, Yuliya V. Sorokina, Irina V. Alekseeva, Tatyana E. Ryumina, Valentina V. Novikova, Anna L. Golovanenko, Elena S. Berezina, Yuliya M. Ladutko	63
Development of the Composition and Technology of a Combined Gel for the Treatment of Osteoarthritis with a Pharmacological Rationale for the Content of Components	
Uljana V. Nogaeva, Julia M. Kotsur, Elena V. Flisyuk, Dmitry Yu. Ivkin, Evgeniy D. Semivelichenko, Irina A. Titovich, Igor A. Narkevich, Victor G. Antonov	69
Three-dimensional Printing of Ramipril Tablets by Fused Deposition Modeling	
Oksana A. Terenteva, Konstantin A. Gusev, Victoria V. Tikhonova, Denis N. Maimistov, Georgiy A. Shandryuk, Elena V. Flisyuk	79
Development of a Mafedine Lyophilizate for Parenteral Use	
Oksana A. Terenteva, Victor A. Vainshtein, Victoria V. Tikhonova, Andrei K. Whaley, Mikhail A. Trofimov, Veronika A. Prikhodko, Larisa V. Shigarova	88
Analytical Methods	
Comparative GC-MS Analysis of the Composition of Metabolites of Aboveground and Underground Parts of <i>Comarum palustre</i> L.	
Jovana Strugar, Anastasia A. Orlova, Maria N. Povydysh	95
Determination of Individual Coumarin in a Dry Extract of <i>Melilotus Officinalis</i> L.	
Mariya V. Aroyan, Yuliya E. Generalova, Inna I. Terninko, Irina E. Kaukhova, Ekaterina K. Novikova	104
Development and Study of the Stability of Comenic Acid Solutions	
Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich	108
The Sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate Quantitative Content	

Determination in a Standard Sample

Elena V. Kuvaeva, Denis A. Kolesnik, Polina O. Levshukova, Inna I. Terninko, Igor P. Yakovlev, Elena V. Fedorova 115

Identification and Quantitative Determination of Arbutin in the Herb of *Orthilia secunda*

Alyona V. Lezina, Inna I. Terninko, Marina V. Krysko 122

Using High Performance Thin Layer Chromatography for the Detection of Pharmacologically Active Secondary Metabolites in *Empetrum nigrum* L.

Anastasiia O. Ponkratova, Andrei K. Whaley, Vladimir G. Luzhanin, Elena V. Zhokhova 129

Comparative Phytochemical Analysis of the Aerial Parts of *Empetrum nigrum* L. Samples, Collected in Various Regions of the Russian Federation

Anastasiia O. Ponkratova, Andrei K. Whaley, Elena V. Zhokhova, Ekaterina A. Bezverkhniaia, Vladimir G. Luzhanin 138

Development of the "Dissolution" Test Method for Tablets of Sodium

4,4'-(propanediamido)dibenzooate with Sustained Release

Elena V. Flisyuk, Julia M. Kotsur, Igor A. Narkevich, Irina E. Smekhova, Dmitry Yu. Ivkin 146

Preclinical and clinical study

Modification of a Model of Non-alcoholic Fat Liver Disease in Rats with a Combination of a Hypercaloric Diet and Hypodynamia

Anna V. Bunyat, Ol'ga M. Spasenkova, Vadim E. Karev, Anna V. Karavaeva, Dmitrij Ju. Ivkin, Aleksandr N. Kulikov, Sergey V. Okovityi, Nadezhda V. Kirillova 155

Effect of the Clathrate Complex of Selenopyran and β -cyclodextrin on the Rate of Healing of a Conditionally Aseptic Full-thickness Planar Wound in Rats

Daniil V. Zayats, Olga V. Buyklinskaya, Julia R. Fedotova, Nikolay S. Felenko 166

Comparative Efficacy of Transdermal Forms for Alopecia Therapy

Uljana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Grigorij A. Plisko, Elena V. Flisyuk, Vladislav E. Kovanskov, Yuri G. Shtyrlin, Kirill O. Sidorov 171

Evaluation of the Neuroprotective Activity of a New Allylmorpholine Derivative in a Rat Model of Traumatic Brain Injury

Veronika A. Prikhodko, Aleksandra V. Kan, Yuriy I. Sysoev, Irina A. Titovich, Natalia A. Anisimova, Sergey V. Okovityi 179

Laboratory Diagnosis of the Tropicamide Non-drug Consumption

Olga Yu. Strelova, Yulia V. Slustovskaya, Alexander N. Grebenyuk 188

Assessment of the Influence of the Mineral Complex of Rutin on the Degree of Expression of Anti-diabetic Activity

Valeriya I. Toporkova, Evgeniy V. Vishnyakov, Kirill O. Sidorov, Inna I. Terninko, Dmitriy Yu. Ivkin 197

Changes in Rat Liver Fatty Acid Profile in Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis

Evgeniy B. Shustov, Anna V. Bunyat, Anna G. Platonova, Olga M. Spasenkova, Nadezhda V. Kirillova, Dmitry Yu. Ivkin, Sergey V. Okovityi, Aleksandr N. Kimaev 206

Юбилей ректора ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России Наркевича Игоря Анатольевича

29 октября 2021 года ректор ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России Наркевич Игорь Анатольевич отметил 55-летний юбилей.

Anniversary of the rector of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University Igor A. Narkevich

On October 29, 2021, the rector of the SPCPU Igor Anatolyevich Narkevich celebrated his 55th anniversary.



Игорь Анатольевич окончил с отличием военно-медицинский факультет при Томском медицинском институте в 1988 г. В 1993 году был назначен преподавателем кафедры военно-медицинского снабжения и фармации Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова и защитил кандидатскую диссертацию, в 2001 году – докторскую диссертацию по специальности «Технология лекарств и организация фармацевтического дела», в 2003 г. – профессор кафедры. С марта 2004 по июль 2009 года возглавлял отдел меди-

цинского снабжения Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. После увольнения из Вооруженных Сил РФ работал проректором по менеджменту качества Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии. В 2010 году избран ректором Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии. С 2011 г. по настоящее время является заведующим кафедрой управления и экономики фармации Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета.

Как ректор СПХФУ, **И. А. Наркевич** добивается успеха, отвечая на непростые вызовы времени, связанные с модернизацией системы высшего образования. Действуя в условиях неопределенности, он обладает исключительной способностью правильной оценки ситуации, умением быстро принять оптимальные решения, мобилизовать коллектив на их выполнение и брать ответственность на себя. Неудивительно, что за 2010–2021 годы в СПХФУ произошли существенные изменения, позволившие ему занять прочное место среди вузов-лидеров и войти в ТОП-100 лучших российских высших учебных заведений.

В условиях перехода отечественной фармацевтической промышленности на инновационный сценарий развития СПХФУ под руководством **И. А. Наркевича** активно участвует в разработке и научном обосновании региональных моделей лекарственного обеспечения, социально-экономических механизмов стимулирования развития фармацевтических предприятий, организации высокотехнологичных отраслевых кластеров как перспективного направления развития отрасли, решении кадровых проблем фармацевтической отрасли.

В 2011 году, с целью осуществления исследований в области создания высокоэффективных и инновационных лекарственных средств с учетом современных научных подходов, был создан Центр

коллективного пользования научным оборудованием «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» (далее – ЦКП), который осуществляет научную, исследовательскую и образовательную функции.

ЦКП является уникальным подразделением и включает в себя центр экспериментальной фармакологии, центр контроля качества лекарств, лабораторию аддитивных технологий, а также GMP тренинг-центр. Создание ЦКП позволило Университету принять активное участие в реализации ФЦП «ФАРМА-2020», в рамках которой были проведены доклинические исследования инновационных лекарственных средств.

В Университете были открыты три научно-образовательных центра открыты и работают при регулярной поддержке индустриальных партнеров СПХФУ: в области технологии рекомбинантных белков – на базе BIOCAD, в области иммунобиотехнологии – на базе СПбНИИВС, НОЦ молекулярных и клеточных технологий – при поддержке BIOCAD и Sartorius.

С целью поиска и разработки активных фармацевтических и пищевых субстанций растительного происхождения реализуется проект фитофармацевтической платформы с участием российских и зарубежных партнеров, открывающий широкие потенциальные возможности для возрождения в России лекарственного растениеводства и развития индустрии натуральных лекарственных и функциональных средств, а также биологически активных добавок.

С помощью созданной системы сетевого взаимодействия по образовательным, научным и воспитательным инициативам, объединяющей более 15 фармацевтических и медицинских вузов России и стран СНГ, СПХФУ выполняет роль координатора научно-образовательного, медицинского, химико-фармацевтического кластера Министерства здравоохранения Российской Федерации.

По инициативе **И. А. Наркевича** на базе Университета создан Отраслевой центр компетенций для фармацевтической отрасли в сфере лекарственного обеспечения, а также две кафедры на базе предприятий-участников инновационного территориального фармацевтического кластера Санкт-Петербурга Университет является членом Международной фармацевтической федерации (FIP), сотрудничает с крупнейшими отечественными и мировыми фармацевтическими компаниями.

С 2018 года по инициативе **И. А. Наркевича** открыт набор студентов на новые направления бакалавриата по специальностям: 04.03.01 «Химия» и 38.03.07 «Товароведение», для подготовки специалистов в области медицинской химии и товароведения медицинских изделий. Университет интегрирован в систему многоуровневой подготовки высококвалифицированных кадров для обеспечения перспективного развития фармацевтической отрасли Российской Федерации.

И. А. Наркевич является координатором НТС «Фармация будущего», а также входит в состав следующих советов:

- координационный совет по развитию фармацевтического кластера в Санкт-Петербурге при Правительстве Санкт-Петербурга (Постановление правительства Санкт-Петербурга от 15.12.2010 № 1692);
- медицинский совет при Губернаторе Санкт-Петербурга (постановление губернатора Санкт-Петербурга от 22.06.10 № 37-пг);
- рабочая группа по мероприятию 2.5. «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» и 5.2.2. «Создание новых образовательных программ и образовательных модулей для высших и средних профессиональных учебных заведений» ФЦП «Фарма-2020» при Минобрнауки РФ;
- приказом Минздрава РФ от 19.11.2013 № 857 «О совете Минздрава РФ по Государственной Фармакопее» входит в состав совета.

Член редколлегии журналов «Фармация», «Ремедиум», «Вестник Витебского государственного медицинского университета», Российский биомедицинский журнал «MEDLINE.RU». Награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, отраслевым знаком «Отличник здравоохранения», медалью Министерства внутренних дел Российской Федерации «За отличие в службе», медалями «200 лет Министерству обороны», «За Веру и Отечество» I степени, серебряной медалью адмирала М. П. Лазарева и другими.

Научная деятельность **И. А. Наркевича** посвящена решению проблем прогнозирования потребности в лекарственных средствах и изделиях медицинского назначения в условиях неопределенности, а также вопросам управления многоуровневыми системами снабжения. Профессор **И. А. Наркевич** – признанный специалист в области медицинского и фармацевтического товароведения, организации фармацевтической помощи в крупных многопрофильных медицинских организациях и обеспечения медицинским имуществом силовых структур.

Под его руководством защищено 10 кандидатских диссертаций и две докторских диссертации.

Является автором более 250 научных и методических трудов, в том числе учебников по управлению и экономике фармации, медицинскому и фармацевтическому товароведению, математике.

Сотрудники СПХФУ поздравляют уважаемого **Игоря Анатольевича** с юбилеем! Желаю творческого вдохновения, здоровья и благополучия! Будьте всегда таким оптимистичным, интересным и высокопрофессиональным специалистом, каким Вас знают родные, коллеги и ученики.

К 10-летию Центра коллективного пользования «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России»

Центр коллективного пользования научным оборудованием «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» (ЦКП) создан на базе Университета в 2011 году с целью осуществления исследований в области создания высокоеффективных и инновационных лекарственных средств с учетом современных научных подходов и осуществляет научную, исследовательскую и образовательную функции.

To the 10th anniversary of the Shared Use Center "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the SPKhFU of the Ministry of Health of Russia"

The Center for Shared Use of Scientific Equipment "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SPKhFU of the Ministry of Health of Russia" (CKU) was established on the basis of the University in 2011 with the aim of carrying out research in the field of creating highly effective and innovative medicines, taking into account modern scientific approaches and carries out scientific, research and educational functions.

ЦКП является уникальным подразделением, которое обеспечивает взаимодействие научного потенциала ведущих фармацевтических школ и направлений Университета, научных практик и специализаций, а также современного оборудования.

Основное направление деятельности ЦКП – обеспечение проведения научных исследований в рамках НИР сотрудниками структурных подразделений университета, а также оказание научно-исследовательских услуг (экспериментальных и консультационных) сторонним пользователям и научным коллективам на коммерческой и/или договорной основе.

Штат ЦКП в настоящий момент составляет свыше 30 научных специалистов более половины из которых имеют ученые степени кандидата и доктора наук. Профессионализм и высокая компетентность сотрудников ЦКП подтверждаются регулярным повышением квалификации, участием в научных форумах различного уровня и географии, а также публикацией статей в научных журналах, входящих в высокорейтинговые научометрические базы.

В состав ЦКП входят:

1. Центр экспериментальной фармакологии (ЦЭФ), состоящий из лаборатории фармакологических исследований, вивария и отдела рутинных биологических процедур. Центр занимается проведением доклинических испытаний лекарственных средств, проводит научные изыскания по токсичности и специфической активности соединений.

2. GMP тренинг-центр, оснащенный современным фармацевтико-технологическим оборудованием и позволяющий проводить работы по разработке технологии твердых, мягких и стерильных лекарственных форм.

3. Испытательная лаборатория (Центр контроля качества лекарственных средств) (ИЛ ЦККЛС) – научно-аналитическое подразделение, осуществляющее деятельность по подтверждению качества лекарственных и парфюмерно-косметических средств, и аккредитованное в национальной системе аккредитации на техническую компетентность и независимость.

4. Лаборатория аддитивных технологий – подразделение, которое специализируется на разработке альтернативных способов производства твердых лекарственных форм (экструзионный способ получения лекарственных форм), в также 3D-печати медицинских изделий и мелкосерийного лабораторного оборудования.

Парк оборудования ЦКП и научно-прикладные компетенции сотрудников позволяют проводить исследования в рамках полного цикла фармацевтической разработки лекарственных средств: от химического, микробиологического синтеза потенциальных лекарственных кандидатов, а также их выделения из растительных объектов и последующей химической модификации, до создания лекарственных препаратов с подбором оптимальной технологии и проведения доклинических исследований.

В 2021 году Центр получил грант Минобрнауки России на обеспечение развития материально-технической инфраструктуры. Реализация мероприятий и выполнение работ направленных на дооснащение Аналитического центра ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, обеспечивающих комплексное развитие инфраструктуры исследовательской деятельности, способствуют повышению уровня ее доступности и реализуют эффективность использования научного оборудования.

На площадке ЦКП проводятся совместные научные исследования в рамках НИР кафедр и структурных подразделений Университета по исследованию новых лекарственных средств (ЛС). За период существования сотрудниками ЦКП выполнена работа по до-клиническому изучению 4 новых ЛС в рамках Государственных контрактов, которая включала в себя все этапы фармацевтической разработки.

Регулярно проводится работа с внешними пользователями в рамках заключенных договоров по разработке аналитических методик контроля качества и их валидации, изучению специфической фармакологической активности и токсичности, выбору оптимальной дозы, разработке технологий как новых ЛС, так и воспроизведенных. Поль-

зователями ЦКП являются представители различных научных школ России и ближнего зарубежья – стран ЕАЭС (Беларусь, Казахстана, Таджикистана, Узбекистана).

Высококвалифицированные специалисты и современный парк аналитического и лабораторного оборудования обуславливают стабильное развитие научного потенциала Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета. В университете сформировался высококвалифицированный профессорско-преподавательский и научный коллектив, способный качественно и эффективно проводить фундаментальные и прикладные научные исследования фармацевтического кластера на современном уровне.

В специальном выпуске журнала размещены публикации, которые отражают основные результаты исследований, проведенных на оборудовании, входящем в структуру Центра коллективного пользования. Исследования были выполнены в соответствии с научными направлениями центра: синтез, изучение структуры и активности новых химических соединений, фармацевтическая разработка (в том числе с применением аддитивных технологий) и доклинические исследования.

Выделения формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов

А. М. Богоутдинова¹, А. К. Уэйли¹, А. О. Понкратова¹, А. А. Орлова¹, М. Ю. Гончаров¹,
В. С. Шпакова², Н. Т. Фарманова³, Д. Х. Нуруллаева³, А. Т. Шарипов³, С. П. Гамбaryan²,
М. Н. Повыдыш^{1*}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

³ Ташкентский Фармацевтический институт, 700015, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Ойбека, д. 45

*Контактное лицо: Повыдыш Мария Николаевна. E-mail: maria.povydыш@pharminnotech.com

ORCID: А. М. Богоутдинова – <https://orcid.org/0000-0002-8218-0177>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; А. А. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-7836-578>; М. Ю. Гончаров – <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>; В. С. Шпакова – <https://orcid.org/0000-0002-9304-7099>; Н. Т. Фарманова – <https://orcid.org/0000-0002-0250-3379>; Д. Х. Нуруллаева – <https://orcid.org/0000-0003-4324-9220>; А. Т. Шарипов – <https://orcid.org/0000-0003-1738-0145>; С. П. Гамбaryan – <https://orcid.org/0000-0002-1470-0791>; М. Н. Повыдыш – <https://orcid.org/0000-0002-7768-905>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 25.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Анализ клинической и лабораторной картины поражения вирусом SARS-CoV-2 позволяет говорить о наличии в патогенезе больных нарушений микроциркуляции и транспортировки кислорода, гемолиза эритроцитов, интраальвеолярного фибринообразования и микротромбообразования. Соответственно, поиск потенциальных антикоагулянтов, антиагрегантов эритроцитарного ряда, мембраностабилизирующих препаратов и мягких тромболитических препаратов способны предотвратить развитие угрожающих жизни осложнений и снизить смертность пациентов COVID-19.

Цель. Выделение формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и выявление молекулярных механизмов его влияния на активацию тромбоцитов *in vitro*, индуцированную TRAP-6 (Thrombin receptor activated peptide) и ADP (Аденозиндинфосфат).

Материалы и методы. Надземные части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) были собраны в питомнике лекарственных растений СПХФУ (Пензенская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км). Выделение формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида осуществляли методом препаративной высокоеффективной жидкостной хроматографии на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором. Структуру формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида подтверждали методом одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III, 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия) в сравнении с литературными данными. Изучение влияния формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида на индуцированную активацию тромбоцитов проводили на тромбоцитах человека, выделенных из крови здоровых добровольцев. Для исследования влияния формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида на агрегацию тромбоцитов использовали метод проточной цитофлуорометрии на приборе Cyto-FLEX (Beckman-Coulter, США).

Результаты и обсуждение. Согласно разработанной в предыдущих исследованиях методики фракционирования и очистки суммарного экстракта травы *O. arvensis* был выделен формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид в индивидуальном виде для последующих биологических исследований со суммарным выходом 30 % в сравнении с его содержанием в изначальном экстрактом. В пробах с формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозидом и ADP наблюдается выраженное ингибиование активации тромбоцитов – процент активных тромбоцитов колеблется в пределах 6,3–6,6 % при дозах формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 3 μM и 30 μM. Ингибирующее действие формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида не носит дозозависимый характер ($p \leq 0,05$). В пробах с формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозидом и TRAP также наблюдается выраженное ингибиование активации тромбоцитов. Процент активных тромбоцитов равен 8 % при дозах формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 15 % при дозах 3 μM, и 16 % при дозе 30 μM. У ингибирующего эффекта формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида наблюдается слабая дозозависимость ($p \leq 0,05$).

Заключение. Введение формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозида в дозах 1 μM, 3 μM, 30 μM выраженно ингибирует активацию тромбоцитов, индуцированную ADP и TRAP-6. Для ADP дозозависимого эффекта не возникает, в то время как для TRAP есть слабый дозозависимый эффект, наибольшая эффективность ингибиции достигается при минимальной исследованной дозе 1 μM. Во всех случаях полученные результаты являются статистически значимыми.

Ключевые слова: *Ononis arvensis*, тромбоциты, формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид, флавоноиды, изофлавоноиды, активация тромбоцитов, проточная цитофлуорометрия

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

Вклад авторов. А. М. Богоутдинова, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, А. А. Орлова, В. С. Шпакова, Н. Т. Фарманова, Д. Х. Нуруллаева, А. Т. Шарипов – экспериментальная работа. М. Ю. Гончаров, С. П. Гамбaryan, М. Н. Повыдыш – обсуждение результатов исследования, подготовка текста статьи.

© Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбaryan С. П., Повыдыш М. Н., 2021

© Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharov M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydыш M. N., 2021

Финансирование. Результаты работы получены в рамках Соглашения № 075-15-2021-967 от 24 сентября 2021 г. при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбaryan С. П., Повыдыш М. Н. Выделения формононетин-7-О-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):14-19. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-14-19](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19)

Isolation of Formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the Grass of *Ononis arvensis* L. and the Assessment of its Effect on Induced Platelet Activation

Alina M. Bogoutdinova¹, Andrei K. Whaley¹, Anastasiia O. Ponkratova¹, Anastasia A. Orlova¹,
Michail Yu. Goncharov¹, Valentina S. Shpakova², Nodira T. Farmanova³,
Dilobar Kh. Nurullaeva³, Avez T. Sharipov³, Stepan P. Gambaryan², Maria N. Povydysh^{1*}

¹ Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

² Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry. I. M. Sechenov Russian Academy of Sciences, 44, Toreza Ave., St. Petersburg, 194223, Russia

³ Tashkent Pharmaceutical Institute, 45, Oybek str., Tashkent, 700015, Uzbekistan

*Corresponding author: Maria N. Povydysh. E-mail: maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: Alina M. Bogoutdinova – <https://orcid.org/0000-0002-8218-0177>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>;
Anastasiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Anastasia A. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-7836-578>;
Michail Yu. Goncharov – <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>; Valentina S. Shpakova – <https://orcid.org/0000-0002-9304-7099>;
Nodira T. Farmanova – <https://orcid.org/0000-0002-0250-3379>; Dilobar Kh. Nurullaeva – <https://orcid.org/0000-0003-4324-9220>;
Avez T. Sharipov – <https://orcid.org/0000-0003-1738-0145>; Stepan P. Gambaryan – <https://orcid.org/0000-0002-1470-0791>; Maria N. Povydysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-905>.

Received: 20.10.2021

Revised: 25.11.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Analysis of the clinical and laboratory picture of the SARS-CoV-2 infection suggests the presence of microcirculation and oxygen transport disorders, hemolysis of erythrocytes, intra-alveolar fibrin formation and microthrombus formation in the patient's pathogenesis. Accordingly, the search for potential anticoagulants, erythrocyte antiplatelet agents, membrane stabilizing drugs and mild thrombolytic drugs can prevent the development of life-threatening complications and reduce the mortality of COVID-19 patients.

Aim. Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and identification of the molecular mechanisms of its effect on platelet activation *in vitro*, induced by TRAP-6 (Thrombin receptor activated peptide) and ADP (adenosine diphosphate).

Materials and methods. Terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. were collected in the SPCPU nursery of medicinal plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozerskoe highway, 38 km). Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside was carried out by preparative high performance liquid chromatography on a Smartline device (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structure of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside was confirmed by one-dimensional and two-dimensional NMR spectroscopy (Bruker Avance III, 400 MHz, Germany), as well as high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Germany). The study of the effect of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside on induced platelet activation was carried out on human platelets isolated from the blood of healthy volunteers. To research the effect of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside on platelet aggregation flow cytometry with Cyto-FLEX (Beckman-Coulter, USA) was used.

Results and discussion. According to the method of fractionation and purification of the total extract of *O. arvensis* developed in previous studies, formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside was isolated in an individual form for subsequent biological studies with a total yield of 30 % in comparison with its content in the original extract. In samples with formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside and ADP, there is a pronounced inhibition of platelet activation – the percentage of active platelets ranges from 6.3–6.6 % at doses of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside 1 μM, 3 μM and 30 μM. The inhibitory effect of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside is not dose-dependent ($p \leq 0.05$). In samples with formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside and TRAP, there is also a pronounced inhibition of platelet activation. The percentage of active platelets is 8 % at 1 μM formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside doses, 15 % at 3 μM doses, and 16 % at 30 μM doses.

Conclusion. Administration of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside at doses of 1 μM, 3 μM, 30 μM strongly inhibits platelet activation induced by ADP and TRAP-6. For ADP, there is no dose-dependent effect, while for TRAP there is a weak dose-dependent effect, the greatest inhibition efficiency is achieved with the minimum investigated dose of 1 μM. In all cases, the results obtained are statistically significant.

Keywords: *Ononis arvensis*, platelets, formononetin-7-O-β-D-glucopyranosid, flavonoids, isoflavonoids, platelet activation, flow cytometry

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. Alina M. Bogoutdinova, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Ponkratova, Anastasia A. Orlova, Valentina S. Shpakova, Nodira T. Farmanova, Dilobar Kh. Nurullaeva, Avez T. Sharipov, Shavkazhon I. Azizov. – experimental work; Michail Yu. Goncharov, Stepan P. Gambaryan, Maria N. Povydysh – discussion of research results, preparation of the text of the article.

Funding. Research results were obtained with financial support from the Russian Ministry of Education and Science in accordance to agreement № 075-15-2021-967 from 24th of September 2021.

For citation: Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharov M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N. Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):14-19. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-14-19](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19)

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным данным, 20–25 % всех препаратов, упомянутых в Фармакопеях, происходят из природных источников, независимо от того, используются ли они в виде индивидуальных природных соединений в неизменном виде, или с небольшими химическими модификациями. Фактически, около 50 % фармацевтических препаратов производятся на основе соединений, впервые идентифицированных или выделенных из растений [1].

Тяжелый острый респираторный синдром, развивающийся при новой коронавирусной инфекции (COVID-19), приводит к значительным человеческим жертвам. Хотя изначально заболевание преимущественно характеризовалось респираторными симптомами, стало ясно, что в него вовлечены и другие системы, включая сердечно-сосудистую. Анализ клинической и лабораторной картины поражения вирусом SARS-CoV-2 позволяет говорить о наличии в патогенезе больных нарушений микроциркуляции и транспортировки кислорода, гемолиза эритроцитов, интраальвеолярного фибринообразования и микротромбообразования. Предупреждение данных процессов, превентивная и ранняя терапия, применение антикоагулянтов, антиагрегантов, мембраностабилизирующих препаратов и, возможно, мягких тромболитических препаратов для амбулаторного применения способны предотвратить развитие угрожающих жизни осложнений и снизить смертность пациентов COVID-19 [2–4]. Таким образом, исследования, связанные с поиском новых антикоагулянтов, антитромбоцитарных и антитромботических средств, имеют важное значение.

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует достаточно препаратов из группы антиагрегантов с различными механизмами действия (клопидогрел, циклопидин, дипиридамол, ацетил-салicyловая кислота), однако в некоторых случаях риски от применения этих препаратов могут превышать их пользу. Например, при наличии сопутствующих заболеваний, связанных с риском повышенных кровотечений, применение таких препаратов противопоказано.

Исследованиям действия препаратов природного происхождения на тромбоциты и поиску новых природных молекул с кардиотропной активностью посвящено большое количество работ [5–7]. Однако в большинстве исследований отмечается только конечный результат действия препаратов без анализа молекулярных механизмов, ответственных за ингибирование, либо активирование тромбоцитов. Известно, что в основе многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит окислительный стресс, часто связанный с местным или системным воспалением [8–10]. Сообщается об антиагрегантной и тромболитической активности природных соединений, относящихся к классу

флавоноидов. Обладая также высоким антиоксидантным потенциалом, данные соединения позволяют увеличить эффективность терапии патологий, сопровождающихся развитием окислительного стресса.

Формонетин и его производные относятся к классу изофлавонов. Для ряда гликозидов формонетина, в том числе формонетин-7-O-β-D-глюкопиранозида показаны антиоксидантная, кардио-протекторная, нейропротекторная, противовоспалительная и антиагрегантная активность и др. [11–16]. Целью данного исследования является выделение формонетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и выявление молекулярных механизмов его влияния на активацию тромбоцитов *in vitro*, индуцированную TRAP-6 (Thrombin receptor activated peptide) и ADP (Аденозиндифосфат).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Надземная часть стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) была собрана в питомнике лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км). Выделение формонетин-7-O-β-D-глюкопиранозида осуществляли методами колоночной хроматографии (Dianion HP-20) и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором, при длине волны 254 нм. Применили хроматографическую колонку Kromasil 100-5C18, 250 × 30 мм. Скорость потока элюента – 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1 % (с H_2O : CH_3CN – 5:95 до H_2O : CH_3CN – 50:50, по объему). Структуру формонетин-7-O-β-D-глюкопиранозида подтверждали методом одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III, 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия).

Изучение влияния формонетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на индуцированную активацию тромбоцитов проводили на тромбоцитах человека, выделенных из крови здоровых добровольцев. Все экспериментальные протоколы одобрены и утверждены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН (протокол № 3-03 от 02.03.20) и соответствуют Хельсинкской декларации. Кровь отбирали в пробирку с цитратным буфером с добавлением EGTA (2,5 μM), центрифугировали 7 минут при 1400 г. Затем отбирали плазму, обогащённую тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP).

Для исследования влияния формонетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на активацию тромбоцитов, индуцированную ADP или TRAP-6, PRP разбавляли HEPES буфером (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM D-глюкозы, 10 mM HEPES, pH = 7.4;

разведение 1:13), затем в пробы вводили гликозид формононетина в концентрациях 1 μ M, 3 μ M, 30 μ M. Пробы с введённым веществом инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем во все пробы за исключением контроля вводили активирующий фактор – ADP 5 μ M или TRAP 5 μ M и фибриноген, меченный Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes, Германия). После инкубации с активирующим фактором в течение 5 минут, реакция останавливалась разведением в фосфатном буфере (PBS) в соотношении 10:1. Для анализа использовали метод проточной цитофлуорометрии на приборе Cyto-FLEX (Beckman Coulter, США). Каждый образец оценивали по 15 000 событий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Фракционирование и очистка суммарного экстракта, полученного из 300 грамм травы стальника полевого с целью выделения формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида в индивидуальном виде для последующих биологических исследований были проведены согласно методике, разработанной в предыдущем исследовании [17]. Сыре подвергали воздушно-теневой сушке, 300 г сырья измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 1,0 мм. Проводили многократную экстракцию сырья 96 % этиловым спиртом в соотношении 1:6.

Первый этап исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракции проводился с равными объемами гексана, затем к спиртовому извлечению добавлялось 50 мл воды очищенной и по аналогии проводили исчерпывающую жидкость-жидкостную экстракцию с равными объемами дихлорметана. Содержание формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида в остаточной водно-спиртовой подфракции после всех этапов жидкость-жидкостной экстракции составило 83 % в сравнении с изначальным экстрактом. В качестве вещества сравнения использовали выделенный в результате предыдущих исследований формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозид [18].

Потери формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида на этапе жидкость-жидкостной экстракции можно объяснить его частичной растворимостью в дихлорметане и также тем фактом, что этиanol способен смешиваться в любых соотношениях как с водой, так и с дихлорметаном, что может вызывать изменения коэффициента распределения формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида.

Остаточную водно-спиртовую подфракцию выпаривали до приблизительного объема 75 мл и загружали на открытую колонку с обращенно-фазовым сорбентом Dianion HP 20. Элюирование проводили аналогично с предыдущими исследованиями с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10 % (с H₂O:96 % EtOH 100:0 до H₂O:96 % EtOH 0:100, по объему). Сбор элюата осуществляют

в колбы по 100 мл. После ВЭЖХ анализа собранных фракций все фракции со значимым содержанием формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида без мешающих, совместно или близко элюирующими пиками объединяли и выпаривали до объема 20 мл. Содержание формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида в полученной фракции после очистки на колонке в сравнении с изначальным экстрактом составило 37 %.

Формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозид затем выделяли в индивидуальном виде путем препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида после очистки на препаративном хроматографе в сравнении с изначальным экстрактом составило 30 %.

Формононетин, начиная с концентрации 1 μ M практически полностью ингибирует ADP-индуцированную активацию тромбоцитов (рисунок 1)

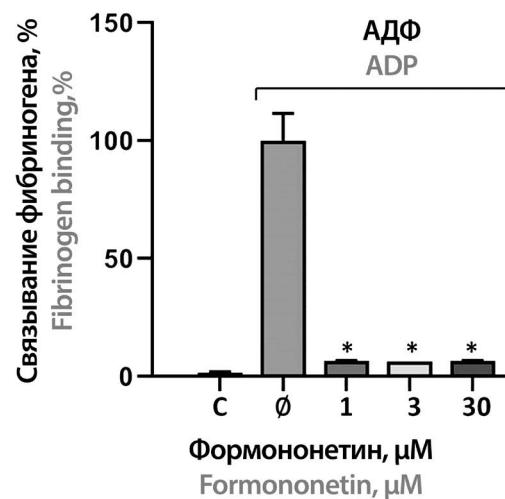


Рисунок 1. Формононетин ингибирует ADP-индуцированную активацию тромбоцитов

Figure 1. Formononetin inhibits ADP-induced platelet activation

Активацию тромбоцитов, вызванную ADP, приняли за 100 % и рассматривали как позитивный контроль. В контрольной пробе без активации наблюдалось 1.5 % активированных тромбоцитов. В пробах с формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозидом и ADP наблюдается выраженное ингибирование активации тромбоцитов – процент активных тромбоцитов колеблется в пределах 6,3–6,6 % при дозах формононетин-7-O- β -D-глюкопиранозида 1 μ M, 3 μ M и 30 μ M. Данные представлены как $M \pm SD$, ($N = 4$, $p \leq 0,05$).

Сходные результаты были получены при активации тромбоцитов TRAP-6, были получены результаты, представленные на (рисунок 2).

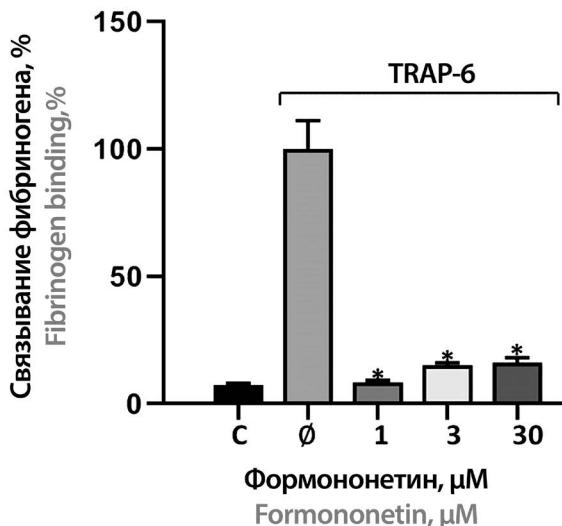


Рисунок 2. Формононетин ингибирует активацию тромбоцитов, вызванную TRAP-6

Figure 2. Formononetin inhibits TRAP-6-induced platelet activation

Как и в первом случае, активацию тромбоцитов, вызванную TRAP-6 в пробе, приняли за 100 %. Процент активированных тромбоцитов в контрольной пробе равен 7,3 %. В пробах с формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозидом и TRAP наблюдается выраженное ингибирование активации тромбоцитов. Процент активных тромбоцитов равен 8 % при дозах формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 15 % при дозах 3 μM, и 16 % при дозе 30 μM. Данные представлены как $M \pm SD$, ($N = 4$, $p \leq 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была дополнена методика выделения формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.), что позволило установить процент выхода формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из суммарного экстракта.

Полученные результаты показали, что формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид значительно ингибирует активацию тромбоцитов, индуцированную ADP и TRAP-6. Для выяснения молекулярных механизмов ингибирующего воздействия формононетина на тромбоциты необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*. 2020;83(3):770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
2. Al-Ani F., Chehade S., Lazo-Langner A. Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review. *Thrombosis research*. 2020;1(192):152–160. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.05.039.

3. Tsoupras A., Lordan R., Zabetakis I. Thrombosis and COVID-19: The Potential role of nutrition. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7:177. DOI: 10.3389/fnut.2020.583080.
4. Громов А. А., Кручинина М. В., Рабко А. В. Коронавирусная болезнь COVID-19: неиспользованные возможности терапии. *Русский медицинский журнал*. 2020;28(9):2–6.
5. Nignpense E. B., Chinkwo K. A., Blanchard C. L., Santhakumar A. B. Polyphenols: modulators of platelet function and platelet microparticle generation? *International journal of molecular sciences*. 2020;21(1):146. DOI: 10.3390/ijms21010146.
6. Olas B. A review of in vitro studies of the anti-platelet potential of citrus fruit flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;112090. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112090.
7. Ивкин Д. Ю., Лужанин В. Г., Карпов А. А., Минасян С. М., Полещенко Я. И., Мамедов А. Э., Повыдыш М. Н., Поройков В. В., Наркевич И. А. Эмбинин-перспективное кардиотоническое средство природного происхождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3:166–170.
8. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:757. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
9. Peoples J. N., Saraf A., Ghazal N., Pham T. T., Kwong J. Q. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(12):1–3. DOI: 10.1038/s12276-019-0355-7.
10. Steven S., Frenis K., Oelze M., Kalinovic S., Kuntic M., Bayo Jimenez M. T., Vujacic-Mirska K., Helmstaedter J., Kröller-Schön S., Münnzel T., Daiber A. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;1–26. DOI: 10.1155/2019/7092151.
11. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
12. Cheng Y., Xia Z., Han Y., Rong J. Plant natural product formononetin protects rat cardiomyocyte H9c2 cells against oxygen glucose deprivation and reoxygenation via inhibiting ROS formation and promoting GSK-3β phosphorylation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;1–11. DOI: 10.1155/2016/2060874.
13. Huang Z., Liu Y., Huang X. Formononetin may protect aged hearts from ischemia/reperfusion damage by enhancing autophagic degradation. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(6):4821–4830. DOI: 10.3892/mmr.2018.9544.
14. Li T., Zhong Y., Tang T., Luo J., Cui H., Fan R., Wang Y., Wang D. Formononetin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via regulation of the PI3K/PTEN/Akt signaling pathway. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:3675. DOI: 10.2147/DDDT.S180837.
15. Zhu H., Zou L., Tian J., Lin F., He J., Hou J. Protective effects of sulphonated formononetin in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion injury. *Planta medica*. 2014;80(04):262–268. DOI: 10.1055/s-0033-1360340.
16. Зверев Я. Ф. Антитромбоцитарная активность флавоноидов. *Вопросы питания*. 2017;86(6):6–20.
17. Лужанин, В. Г., Уэйли, А. К., Понкрадова, А. О., Гришукова, Е. А., Сулоев, И. С., Смирнов, С. Н., Серебряков, Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.

REFERENCES

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*. 2020;83(3):770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
2. Al-Ani F., Chehade S., Lazo-Langner A. Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review. *Thrombosis research*. 2020;1(192):152–160. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.05.039.

3. Tsoupras A., Lordan R., Zabetakis I. Thrombosis and COVID-19: The Potential role of nutrition. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7:177. DOI: 10.3389/fnut.2020.583080.
4. Gromov A. A., Kruchinina M. V., Rabko A. V. Coronavirus disease CVID-19 - unused therapy opportunities. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2020;28(9):2–6. (In Russ.)
5. Nignpense E. B., Chinkwo K. A., Blanchard C. L., Santhakumar A. B. Polyphenols: modulators of platelet function and platelet microparticle generation? *International journal of molecular sciences*. 2020;21(1):146. DOI: 10.3390/ijms21010146.
6. Olas B. A review of in vitro studies of the anti-platelet potential of citrus fruit flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;112090. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112090.
7. Ivkin D. Yu., Luzhanin V. G., Karpov A. A., Minasyan S. M., Poleshchenko Ya. I., Mamedov A. E., Povydysh M. N., Poroykov V. V., Narkevich I. A. Embinin is a perspective cardiotonic mean for natural origin. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;3:166–170. (In Russ.)
8. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gariglio G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:757. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
9. Peoples J. N., Saraf A., Ghazal N., Pham T. T., Kwong J. Q. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(12):1–3. DOI: 10.1038/s12276-019-0355-7.
10. Steven S., Frenis K., Oelze M., Kalinovic S., Kuntic M., Bayo Jimenez M. T., Vujacic-Mirski K., Helmstädtler J., Kröller-Schön S., Münzel T., Daiber A. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;1–26. DOI: 10.1155/2019/7092151.
11. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
12. Cheng Y., Xia Z., Han Y., Rong J. Plant natural product formononetin protects rat cardiomyocyte H9c2 cells against oxygen glucose deprivation and reoxygenation via inhibiting ROS formation and promoting GSK-3 β phosphorylation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;1–11. DOI: 10.1155/2016/2060874.
13. Huang Z., Liu Y., Huang X. Formononetin may protect aged hearts from ischemia/reperfusion damage by enhancing autophagic degradation. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(6):4821–4830. DOI: 10.3892/mmr.2018.9544.
14. Li T., Zhong Y., Tang T., Luo J., Cui H., Fan R., Wang Y., Wang D. Formononetin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via regulation of the PI3K/PTEN/Akt signaling pathway. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:3675. DOI: 10.2147/DDDT.S180837.
15. Zhu H., Zou L., Tian J., Lin F., He J., Hou J. Protective effects of sulphonated formononetin in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion injury. *Planta medica*. 2014;80(04):262–268. DOI: 10.1055/s-0033-1360340.
16. Zverev Ya. F. *Antitrombotsitarnaya aktivnost flavonoidov* [Antiplatelet activity of flavonoids]. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2017;86(6):6–20. (In Russ.)
17. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of individual compounds from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. and *Solidago canadensis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):83–89. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89>.



Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца

А. А. Жигалина*, В. Г. Дударев, В. В. Тихонова, О. Ю. Стрелова

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Жигалина Анна Анатольевна. E-mail: zhigalina.anna@spcpu.ru

ORCID: А. А. Жигалина – <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>; В. Г. Дударев – <https://orcid.org/0000-0002-8003-3173>; В. В. Тихонова – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>; О. Ю. Стрелова – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 29.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Применение стандартных образцов (СО) обеспечивает метрологическую сопоставимость и сходимость результатов, выполненных в разных лабораториях, разными аналитиками, в разное время. Генистейн является перспективным веществом, обладающим широким спектром фармакологического действия и широко используемым в БАВ. Разработка нормативной документации на СО генистеина позволит обеспечить качество лекарственных средств и БАВ.

Цель. совершенствования путей синтеза и определение спектральных характеристик генистеина для аттестации СО.

Материалы и методы. Использовали синтетический генистейн, (к. х. н. В. Ю. Ковтуном НПЦ «Фармзащита») (образец № 1) и образец № 2, синтезированный и изучаемый на кафедрах фармацевтической химии и химической технологии лекарственных веществ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (ХТЛВ СПХФУ). Инфракрасные спектры образцов генистеина записывали на Фурье-спектрометре инфракрасном ФСМ 1201 (ООО «Инфраспек», Россия) в диске с калия бромидом в области частот от 4000 до 500 cm^{-1} . Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записаны на ЯМР-спектрометре BrukerAvance III (400 и 100 МГц) (Bruker, Германия) в растворителе ДМСО- d_6 . Раман-спектры были записаны на аналитической системе комбинационного рассеяния света ОРТЕС-785TRS-2700, при мощности лазерного излучения равной 100 мВт (АО «ОПТЭК», Россия). Продолжительность воздействия лазерного излучения составляло: 5, 10, 20 и 60 сек. Обработка результатов осуществлялась с помощью ПО «BWSpec 4.10_4», США. ГХ-МС проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890A с автоинжектором 7693 и масс-спектрометрическим детектором 5975C фирмы «Hewlett Packard».

Результаты и обсуждение. Проведен синтез по методике разработчика с совершенствованием на стадии реакции «снятия алкильной защиты». Спектры промежуточного продукта синтеза генистеина (биочамина А) соответствует литературным данным. Образцы генистеина исследовались методами: ЯМР ^{13}C и ^1H , было определено, структура исследуемого вещества подтверждена; Рамановская и ИК-спектроскопии показали, что спектры образцов не отличаются между собой, дополнительные сигналы в них отсутствуют.

Заключение. Получены спектральные характеристики образцов генистеина, методами ЯМР, ИК и рамановской спектроскопии, которые будут использованы в нормативной документации на СО генистеина, и позволять проводить контроль качества лекарственных средств на его основе и выявлять недоброкачественные БАД.

Ключевые слова: генистейн, стандартный образец, ЯМР, ИК, рамановская спектроскопия

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

Вклад авторов. А. А. Жигалина, О. Ю. Стрелова, В. Г. Дударев спланировали эксперимент, В. Г. Дударев синтезировал образцы. В. В. Тихонова провела исследования методом рамановской спектроскопии. А. А. Жигалина, О. Ю. Стрелова, В. Г. Дударев участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обработке данных и в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Жигалина А. А., Дударев В. Г., Тихонова В. В., Стрелова О. Ю. Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4–1):20–31. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-20-31](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31)

Development of Genistein Synthesis for Use as a Certified Reference Material

Anna A. Zhigalina*, Vladimir G. Dudarev, Viktoria V. Tikhonova, Olga Yu. Strelova

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Anna A. Zhigalina. E-mail: zhigalina.anna@spcpu.ru

ORCID: Anna A. Zhigalina – <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>; Vladimir G. Dudarev – <https://orcid.org/0000-0002-8003-3173>; Viktoria V. Tikhonova – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>; Olga Yu. Strelova – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>. Avez T. Sharipov – <https://orcid.org/0000-0003-1738-0145>; Stepan P. Gambaryan – <https://orcid.org/0000-0002-1470-0791>; Maria N. Povdysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-905>.

Received: 20.10.2021

Revised: 29.11.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. The use of certified reference materials (CRMs) ensures metrological traceability and comparability of analysis results performed in different laboratories, by different analysts, at different times. Genistein is a promising substance with a wide spectrum of pharmacological action. genistein is widely used in dietary supplements. Development of regulatory documents for CRM of genistein will ensure the quality of drugs and dietary supplements.

Aim. Aim of our study is to improve of the ways of synthesis and determination of spectrum characteristics of genistein for the certification of CRM.

Materials and methods. We used synthetic genistein, (Ph.D. V. Yu. Kovtun SPC "Pharmzashchita") (sample № 1) and genistein synthesized and studied at the departments of pharmaceutical chemistry and chemical technology of medicinal substances SPCPU (sample № 2). Infrared spectra of genistein samples were collected on an FSM 1201 infrared Fourier spectrometer (OOO Infraspek, Russia) via KBr pellets technique. All the spectra were collected in the 4000–500 cm^{-1} range. The NMR (^1H and ^{13}C) measurements were performed with a BrukerAvance III NMR spectrometer (400 and 100 MHz) (Bruker, Germany) in DMSO- d_6 solvent. Raman spectra were recorded by an ORTES-785TRS-2700 analytical Raman scattering system at a laser power of 100 mW (OPTEC JSC, Russia). Laser interaction time was 5, 10, 20 and 60 seconds. The results were processed using the software "BWSpec 4.10_4", USA. GC-MS was performed on an Agilent Technologies 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, USA) with a 7693 autoinjector and a Hewlett Packard 5975C mass selective detector.

Results and discussion. The synthesis was carried out according to the developer's method. The stage "removal of the alkyl protection" has been improved. The spectra of the synthesis intermediate of genistein (biochanin A) correspond to the literature data. Samples of genistein were investigated by methods: MC and NMR ^{13}C , ^1H . The structure of the investigated substance was confirmed; Raman and IR spectroscopy showed that the spectra of the samples do not differ from each other and there are no additional signals.

Conclusion. The spectrum characteristics of samples of genistein were obtained by NMR, IR and Raman spectroscopy, which will be used in the regulatory documentation for CRM of genistein. All of this will make it possible to control the quality of medicines based on it and to identify substandard dietary supplements.

Keywords: genistein, CRM, NMR, IR, Raman 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. Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova, Vladimir G. Dudarev planned an experiment, Vladimir G. Dudarev synthesized samples. Viktoria V. Tikhonova conducted research by the method of Raman spectroscopy. Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova, Vladimir G. Dudarev participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Zhigalina A. A., Dudarev V. G., Tikhonova V. V., Strelova O. Yu. Development of genistein synthesis for use as a certified reference material. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):20–31. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-20-31](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31)

ВВЕДЕНИЕ

Применение стандартных образцов (СО) обеспечивает метрологическую сопоставимость и сходимость результатов анализа, выполненных в разных лабораториях, разными аналитиками, в разное время [1, 2]. Однако разработка, регистрация и внедрение в практическую деятельность стандартных образцов сталкиваются с рядом проблем: отсутствие единого понимания термина «стандартный образец» в различных нормативных актах Российской Федерации, разноплановость классификации СО [3–6].

Основной проблемой в РФ является отсутствие фармакопейных СО. Применение импортных СО имеет свои недостатки такие как, малые количества, высокая стоимость и длительность доставки [7–9]. Также много исследований направлено разработки методик без использования стандартных образцов из-за ситуации в РФ [9]. Таким образом, актуальной задачей является воссоздание отечественных фармакопейных СО для надлежащего функционирования системы контроля качества [2, 4, 5].

Одно из актуальных направлений современной медицины – поиск новых высокоэффективных лекарственных препаратов с широким спектром фармакологического действия и низкой токсичностью. Большой интерес представляют вещества природного происхождения, флавоноиды, которые обладают противоопухолевой и антитромбоцитарной активностью, и, в частности, генистин [10–12]. Это природный изофлавон, в значительном количестве представленный в растениях семейства Бобовые (*Fabaceae*). В исследованиях показано, что генистин оказывает положительный эффект при профилактике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза у женщин в период менопаузы, проявляет гипохолестеринемическое и антидиабетическое действие, а также обладает радиозащитными свойствами [13–15]. Препараты на основе сои содержат в своем составе комплекс изофлавонов, и при маркировке некоторых БАД не указывают, какие изофлавоны включены, указывается только суммарное количество. Таким образом, проводить стандартизацию не представляется возможным.

Суммарное содержание флавоноидов в семенах сои колеблется от 0,5 до 0,7 %. На 100 г сухого продукта содержится изофлавонов: Генистин, 166,4 мг (0,16 %); Дайдзин, мг 58,1 (0,058 %); Глицитин, 33,8 мг (0,034); Куместрол, мг 0,04 (0,0004 %); Изофлавоны в сои связаны гликозидной связью с сахарным остатком [14]. Генистин получают метод экстрагирования из лекарственного растительного сырья. В связи с тем, что выход данного метода составляет около 40 %, необходимы значительные количества лекарственного растительного сырья [16]. Данный метод трудоемок в плане очистки и получении индивидуального вещества. Сырьевая база производства сои на территории Российской Федерации ограничена. Осложняется ситуация еще и тем, что выращенная соя используется в основном в пищевой промышленности и в качестве кормовой культуры в сельском хозяйстве.

Целью нашего исследования явилось совершенствование путей синтеза и определение спектральных характеристик образцов генистеина

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали синтетический генистин, предоставленного к. х. н. В. Ю. Ковтуном (НПЦ «Фармзащита» ФМБА России г. Химки Московской обл.) (образец № 1) и образец № 2, генистин, синтезированный и изучаемый на кафедрах фармацевтической химии и химической технологии лекарственных веществ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Инфракрасные спектры образцов генистеина записывали на Фурье-спектрометре инфракрасном ФСМ 1201 (ООО «Инфраспек», Россия) в диске с калием бромидом в области частот от 4000 до 500 см⁻¹.

Спектры ядерного магнитного резонанса ¹Н и ¹³С образцов генистеина записаны на ЯМР-спектрометре BrukerAvance III (400 и 100 МГц) (Bruker, Германия) в растворителе ДМСО-d6.

Раман-спектры образцов генистеина были записаны на аналитической системе комбинационного рассеяния света ОРТЕС-785TRS-2700, при мощности лазерного излучения равной 100 мВт (АО «ОПТЭК», Россия). Продолжительность воздействия лазерного излучения составляло: 5, 10, 20 и 60 секунд. Обработка результатов осуществлялась с помощью ПО «BWSpec 4.10_4», США.

ГХ-МС проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890A с автоинжектором 7693 и масс-селективным детектором 5975C фирмы «Hewlett Packard».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных ранее на кафедрах фармацевтической химии и фармакогнозии СПХФУ исследованиях, была дана сравнительная характеристика извлечения из жмыха семян сои культурной (*Glycine max L. Merr.*) и образца генистеина, предоставленного к. х. н. В. Ю. Ковтуном (НПЦ «Фармзащита» ФМБА Рос-

сии г. Химки Московской обл.). В опубликованной работе [15] было показано, что для исследования методом ГХ-МС генистеина необходимо было получение его дериватов реакцией силирования. Анализ методом ГХ-МС показал, что в природном образце присутствовали два пика со временами удерживания около 13,71 и около 13,76 мин, тогда как в синтетическом образце отмечался один пик со временем удерживания около 13,76 мин. При идентификации масс-спектров с помощью специализированной библиотеки «NIST08.L» с использованием программы AMDIS, было выявлено, что масс-спектр вещества со временем удерживания около 13,76 мин совпал со спектром 5,7,4'-три(триметилсилил)генистеина, в то время как масс-спектр вещества со временем удерживания около 13,71 мин совпал с ди(триметил)силилдайдзеином. Авторы сделали вывод, что в природном образце присутствует родственный изофлавон – дайдзеин [15]. Таким образом, синтетический метод получения генистеина предпочтительней для разработки СО и его дальнейшей аттестации.

В ФМБА НПЦ «Фармзащита» (к. х. н. В. Ю. Ковтун) была разработана схема синтеза (рисунок 1), которая на наш взгляд позволит решить вопрос разработки СО генистеина для оценки качества лекарственных средств и БАД, содержащих данный изофлавон. Выход составил 76 % с чистотой 98+ % по ВЭЖХ [17].

Для определения параметров качества и подтверждения структуры вещества были выбраны общезвестные методы, такие как ЯМР и ИК-спектроскопия, а также рамановская спектроскопия [18].

Результаты спектрального анализа генистеина (образец № 1) методами ИК и ¹Н и ¹³С ЯМР-спектроскопии представлен на рисунках 2, 3 и 4

При проведении расшифровки ИК-спектра образца 1 (рисунок 2) генистеина особое внимание стоит уделить «зоне отпечатков пальцев» (от 1600 до 400 нм⁻¹), так как здесь находятся основные полосы, необходимые для идентификации образца. Следует отметить полосы 1583 см⁻¹, 1614 см⁻¹, 810 см⁻¹, 819 см⁻¹, 841 см⁻¹, 852 см⁻¹, 1201 см⁻¹, 1423 см⁻¹, 1365 см⁻¹. Из другой области стоит выделить полосу поглощения 3412 см⁻¹, которая говорит о наличии внутримолекулярной водородной связи между ОН-группой в 5 и С=O группой в 4 положении.

Спектр ¹Н ЯМР показал (рисунок 3), наличие пика с ppm 8,31, который соответствует протону в положении 2 кольца С, это показывает, что данный флавоноид относится в группу изофлавонов, также следует отметить дуплеты 6,81; 6,83 ppm, соответствующие протонам в положениях 3', 5' и 7,37; 7,39 ppm 2', 6' кольца В, 6,23 протона в положении и 6,38 протона 8 положения кольца А и 12,96 – ОН группы 5 положения и 10,89 – ОН 7 положения кольца А.

Расшифровка спектра представлена на рисунке 4 в соответствии с номером углерода, указанного на рисунке 5.

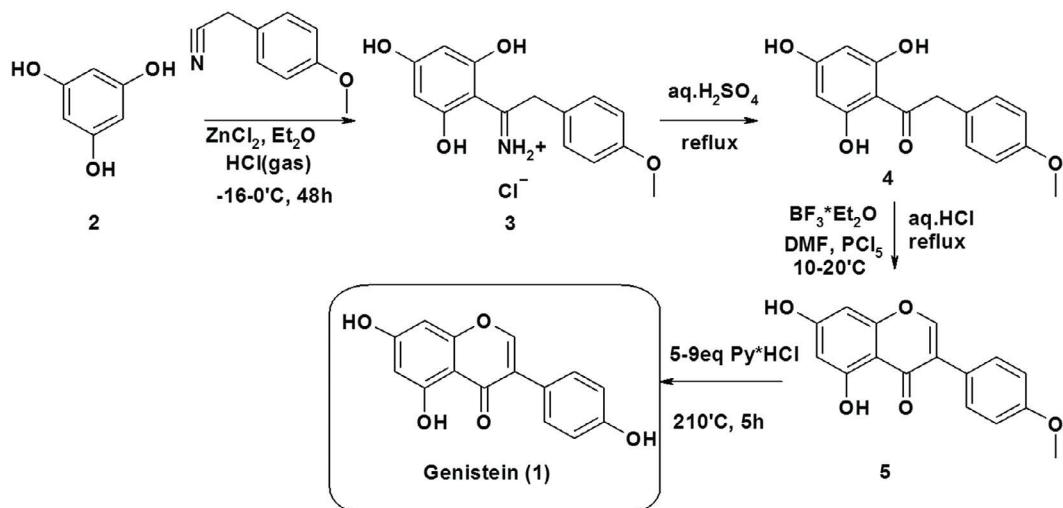


Рисунок 1. Схема синтеза генистеина (образец № 1)

Figure 1. The scheme of synthesis of genisteine (sample № 1)

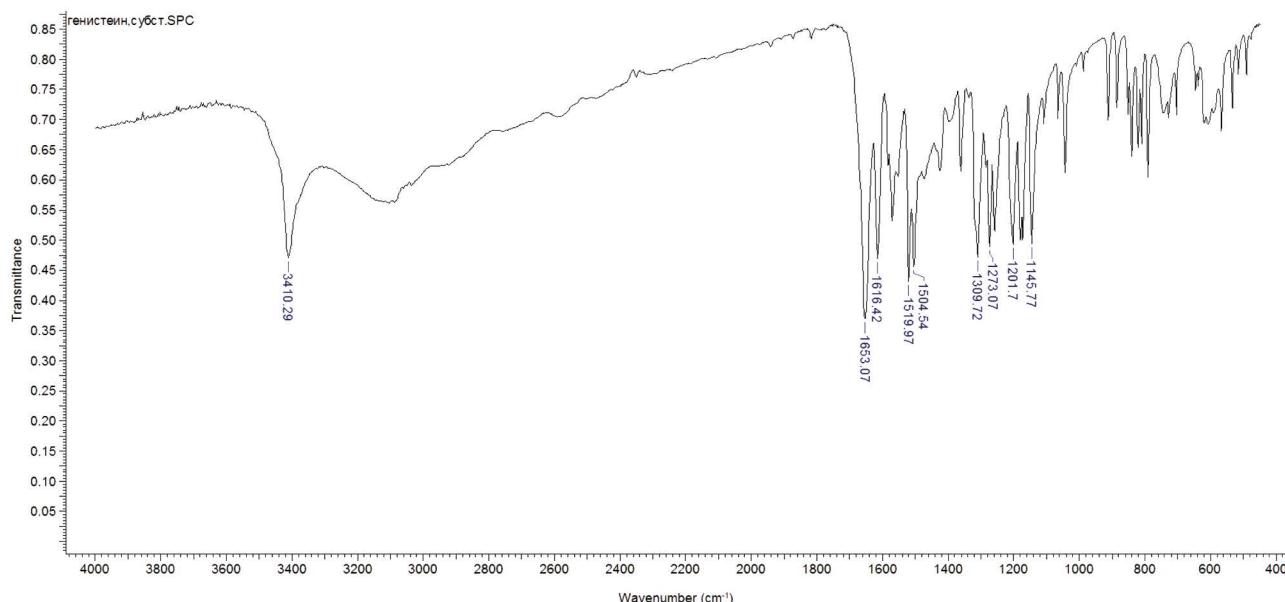


Рисунок 2. ИК-спектр генистеина № 1

Figure 2. IR-spectrum of genistein № 1

Таким образом, при анализе ЯМР-спектров ^{13}C и ^1H образца генистеина было определено, что все пики полностью соответствуют структуре исследуемого вещества.

Проведено исследование образца методом рамановской спектроскопии в зависимости от времени. Данный метод обладает рядом достоинств, экспрессность, возможность проведения анализа через упаковку (бумагу, пластик и другие полимеры) при анализе готовых лекарственных средств и БАД, получение данных из дальней инфракрасной области, а также отсутствие необходимости подготовка образца пе-

ред анализом. Рамановская спектроскопия является неразрушающим аналитическим методом. Спектры представлены на рисунках 5–8.

В ходе проведенного исследования было выяснено, что спектры образца генистеина, полученные при разном времени экспозиции, не отличаются между собой, кроме того, в них отсутствуют дополнительные сигналы (рисунок 10). Таким образом, индивидуальная молекула образца генистеина № 1 подтверждена.

Исследование образца № 1 генистеина методом ГХ-МС с применением методики силилирования пока-

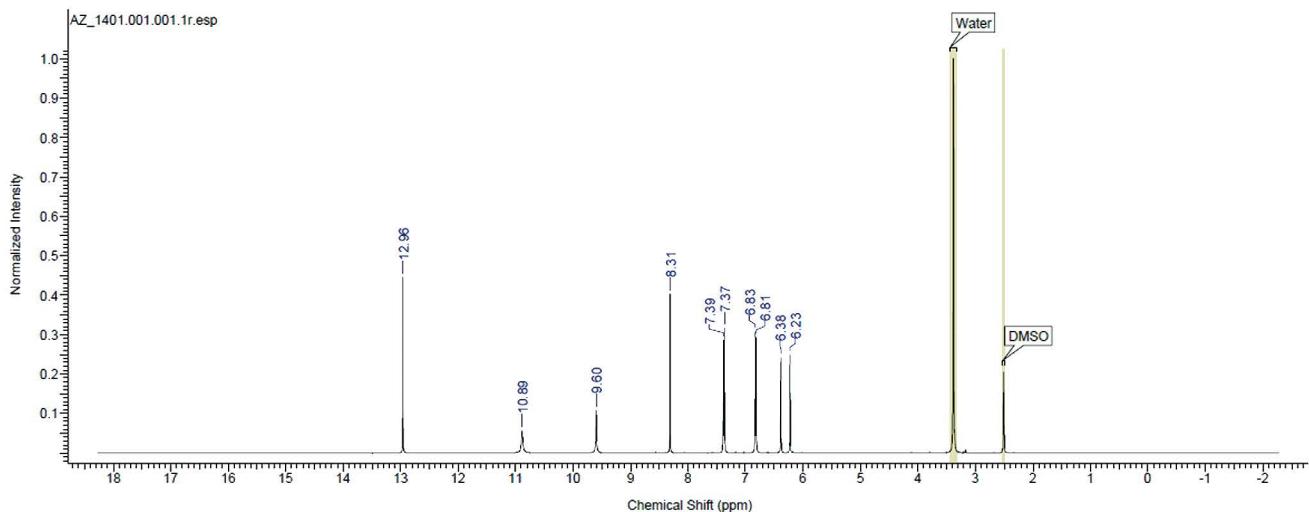


Рисунок 3. ^1H ЯМР-спектр генистеина № 1

Figure 3. ^1H NMR spectrum of genistein Nº 1

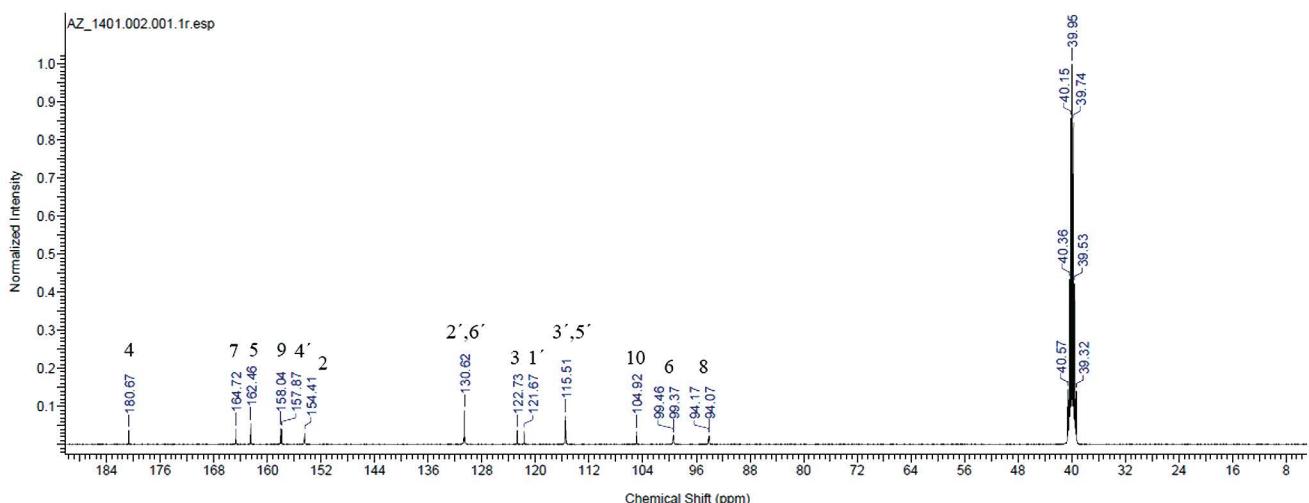


Рисунок 4. ^{13}C ЯМР-спектр образца генистеина № 1

Figure 4. ^{13}C NMR spectrum of genistein № 1

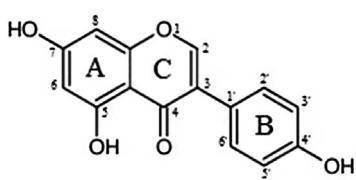


Рисунок 5. Структурная формула генистеина

Figure 5. The structural formula of genistein

зали результаты, сопоставимые с данными предыдущих исследований: один пик со временем удерживания около 13.76 мин и масс-спектром (пик молекулярного иона 471 и осколочные пика 73, 228 и 399) [15].

На кафедре ХТЛВ, СПХФУ схема синтеза, представленная на рисунке 1 была усовершенствована (рисунки 11 и 12).

1 этап. Формилирование и циклизация «дезокси-бензоина», вначале образуется полупродукт с формильными остатками по 5 и 7 ОН – группам. Далее происходит гидролиз сложноэфирных групп с выходом на данной стадии 96 %.

2 этап. Снятие алкильной защиты. В отчете по научной работе было указано, что бромисто-водородная кислота неэффективна в данном процессе из-за плохой растворимости субстрата [17]. Нами было установлено, что использование ледяной уксусной кислоты в качестве сорастворителя, позволило решить эту проблему, и гидролиз при 110 °C проходил за 3 ч.

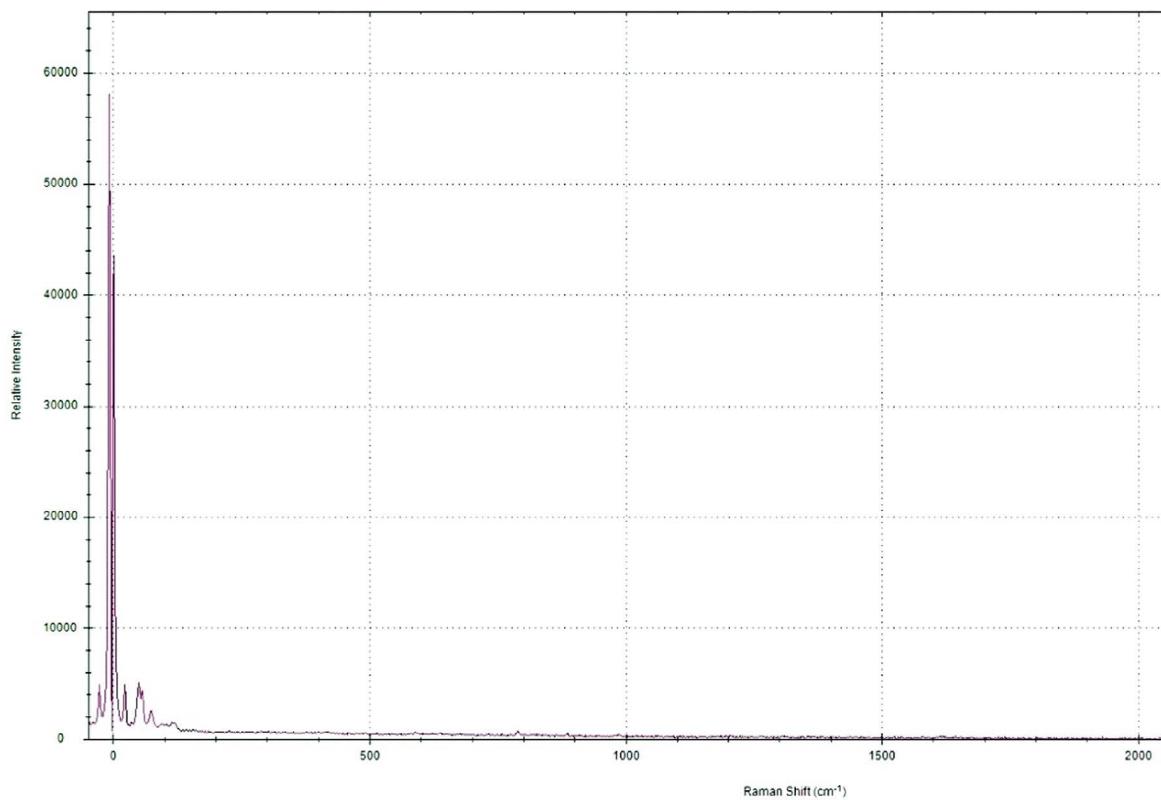


Рисунок 6. Раман-спектр генистеина № 1 (продолжительность записи 5 сек)

Figure 6. Raman-spectrum of genistein № 1 (laser interaction time was 5 sec)

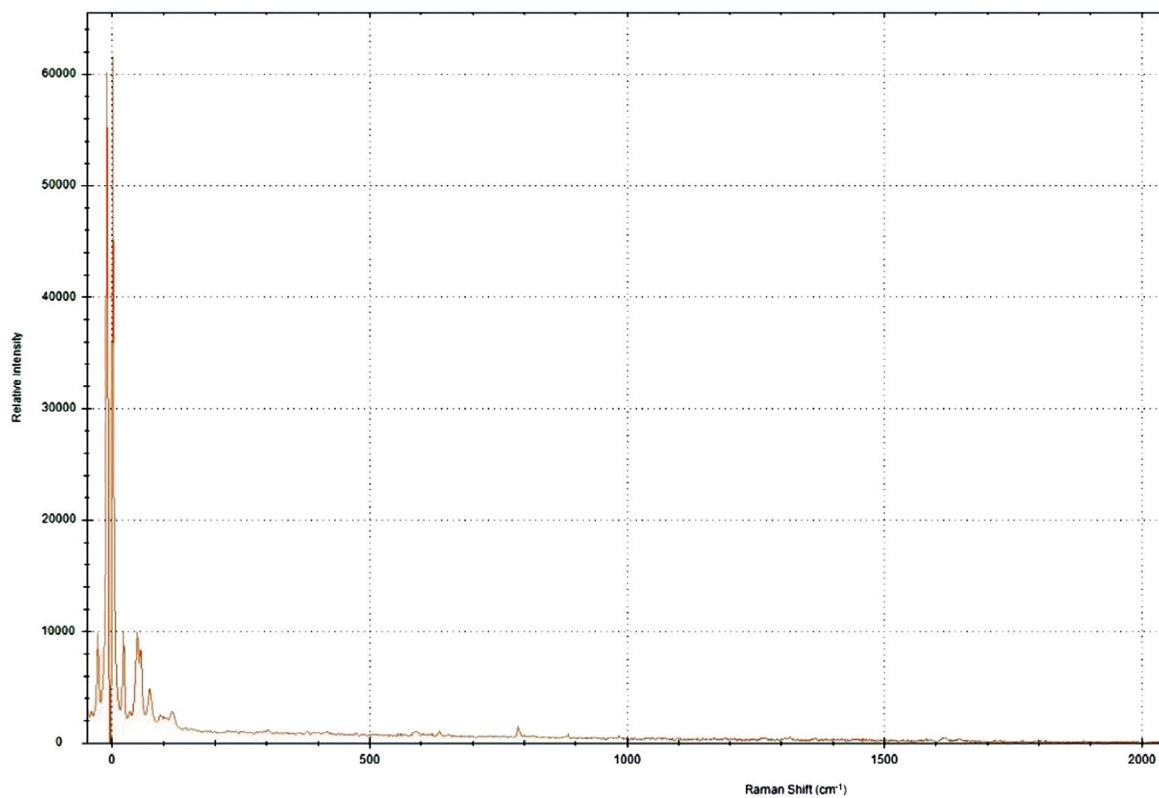


Рисунок 7. Раман-спектр генистеина № 1 (продолжительность записи 10 сек)

Figure 7. Raman-spectrum of genistein № 1 (laser interaction time was 10 sec)

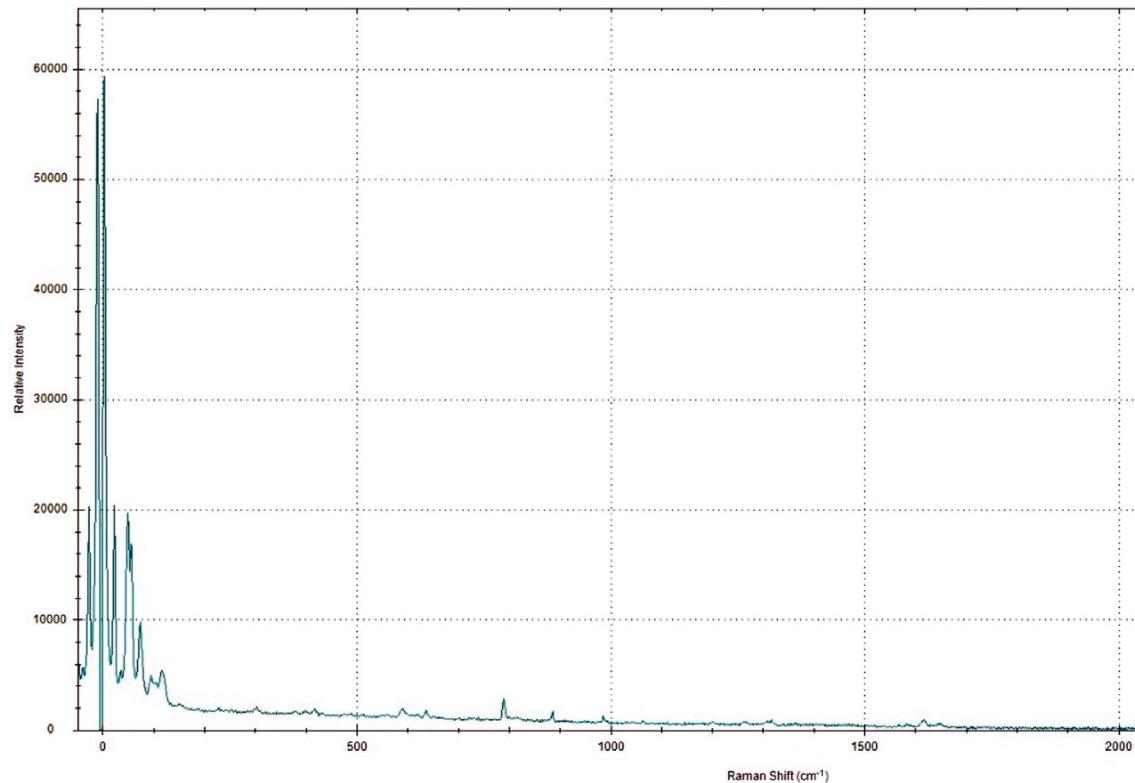


Рисунок 8. Раман-спектр генистеина № 1 (продолжительность записи 20 сек)

Figure 8. Raman.spectrum of genistein № 1 (laser interaction time was 20 sec)

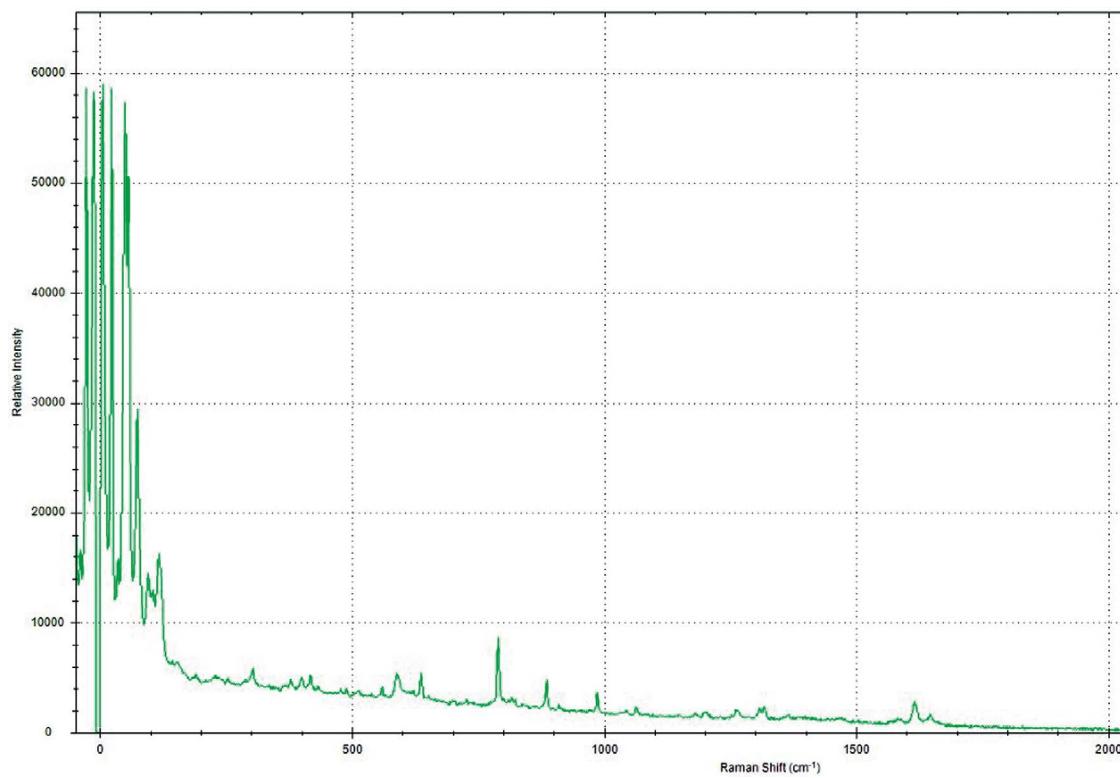


Рисунок 9. Раман-спектр генистеина № 1 (продолжительность записи 60 сек)

Figure 9. Raman-spectrum of genistein № 1 (laser interaction time was 60 sec)

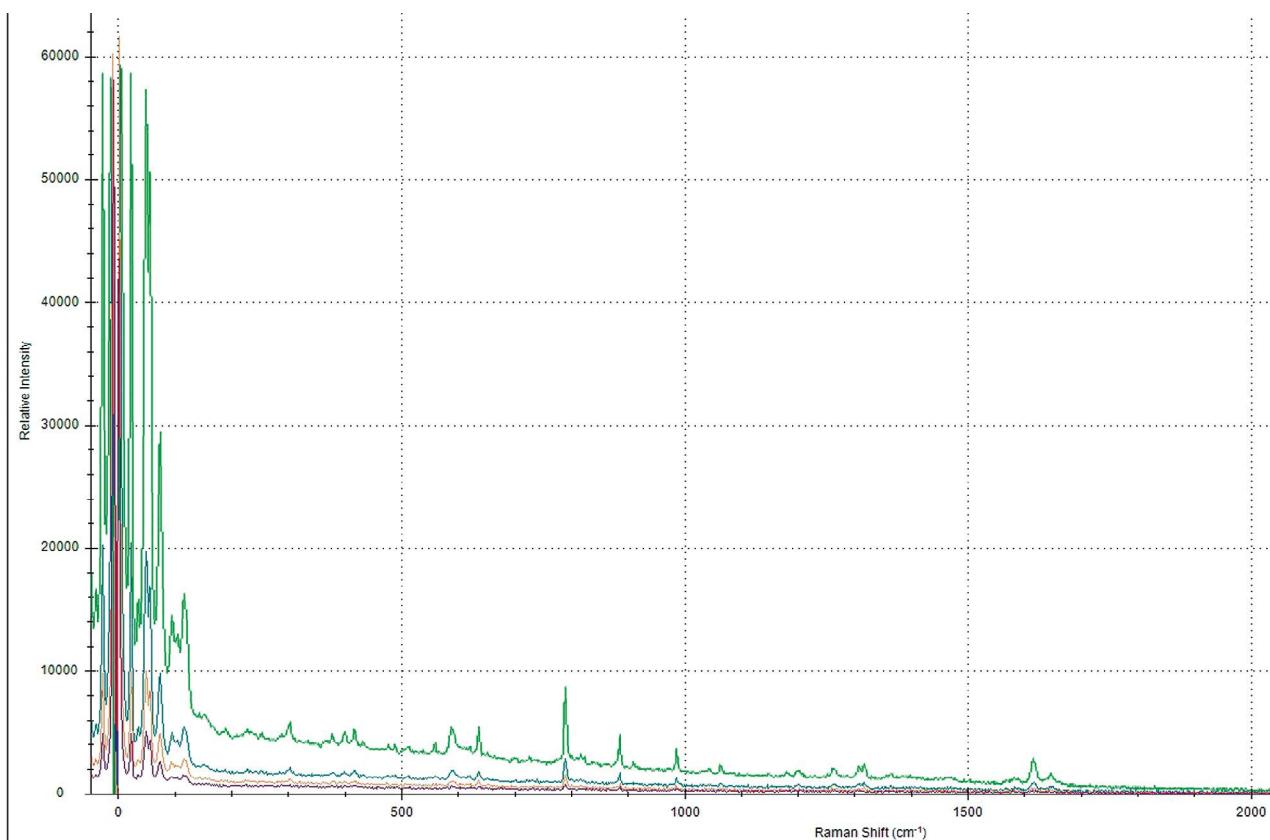


Рисунок 10. Раман-спектры генистеина № 1 (продолжительность 5, 10, 20, 60 с)

Figure 10. Raman-spectra of genistein № 1 (laser interaction time was 5, 10, 20, 60 sec)

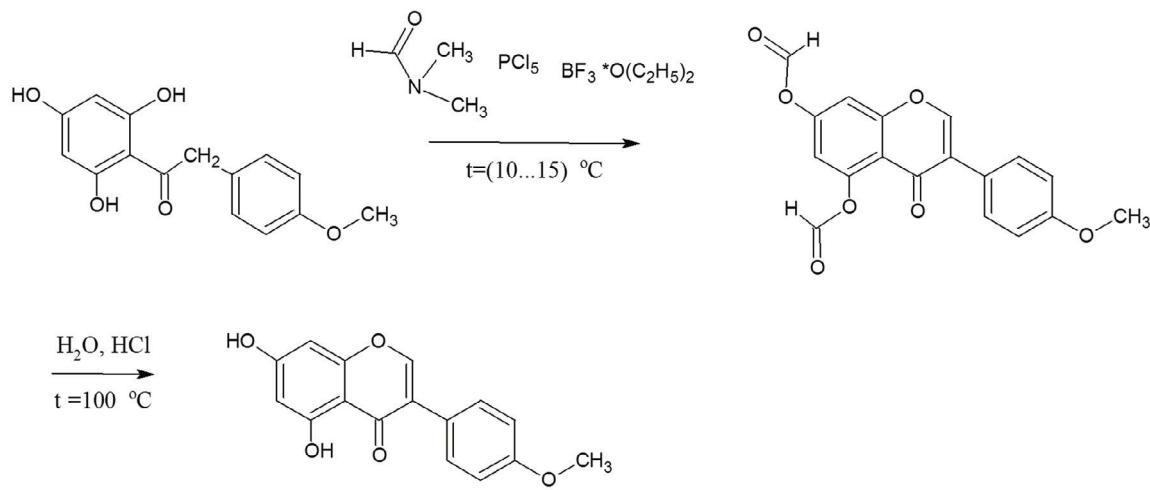


Рисунок 11. Схема реакций формилирования и циклизации в биочанин А

Figure 11. The scheme of reactions of formylation and cyclization to biochanin A

Установлено, что при проведении реакции «снятии алкильной защиты» бромистоводородной кислотой образуется побочный продукт, нерастворимый в ацетоне, представляющий собой продукт поликонденсации с раскрытием кольца С. Данная побочная реакция уменьшает выход генистеина до 40 %. Био-

чанин А представляет собой светло-бежевый порошок, генистин – кирпично-красный мелкокристаллический порошок.

В процессе синтеза проводили исследование методами ТСХ полупродуктов (биочанина А) и полученного генистеина (образец № 2) (рисунок 13) Оно

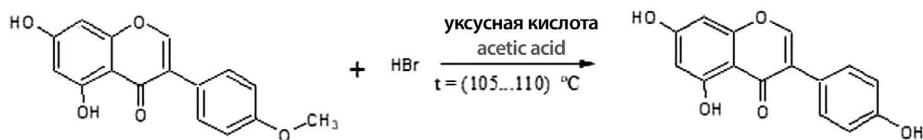


Рисунок 12. Схема снятия алкильной защиты

Figure 12. The scheme of the stage "removal of the alkyl protection"

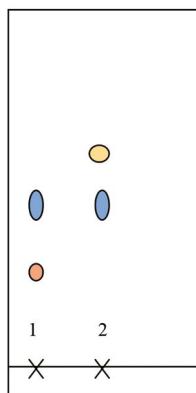


Рисунок 13. ТСХ исследование продуктов синтеза по схеме СПХФУ.

1 – Генистейн тех. (образец № 2); 2 – Биочанин А

Figure 13. TLC study of synthesis products according to SPCPU scheme.

1 – Genistein of those. (sample No. 2); 2 – Biochanin A

показало в генистеине тех. № 2 (оранжевое пятно) присутствует примесь биочанина А (голубые пятна), в Биочанине А присутствует продукт синтеза с формильными остатками по 5 и 7 OH-группам (желтое пятно).

На рисунках 14 и 15 представлены спектры ЯМР ¹Н. Из спектров, сравнении данных литературы [19, 20] и полученных в эксперименте (таблице 1), видно, что спектры биочанина А и генистеина соответствуют литературным данным. По данным ¹Н ЯМР образцы полученных веществ содержат не более 2–3 % примесей: пики квартета 3,47, 3,44, 3,46, 3,42, 2,56; 1,92; триплет 1,08, 1,06, 1,04. Так же виден пик 3,79, что свидетельствует о присутствии полупродукта синтеза биочанина А.

Таблица 1. Отнесение сигналов спектров ЯМР ¹Н

Table 1. Assignment of ¹H NMR signals

Протоны Protons	Положение сигнала, ppm Signal position, ppm	
	Биочанин А Biochanin A Литература [19] Literature [19]	Генистейн (без перекристаллизации) Genistein (no recrystallization) Литература [20] Literature [20]
-OCH ₃	3,79	3,79
8	6,23	6,23
6	6,39	6,39
3', 5'	7,00	6,99
2', 6'	7,50	7,49
2	8,37	8,34
4'-ОН	–	9,61 (s, 1 H, Ar-OH)
7-ОН	10,91	10,90
5-ОН	12,93	12,96(s, 1 H, Ar-OH)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при изучении образца генистеина методами ЯМР, ИК, рамановской спектроскопии (таблица 2), были определены спектральные характеристики, которые планируются ввести в норматив-

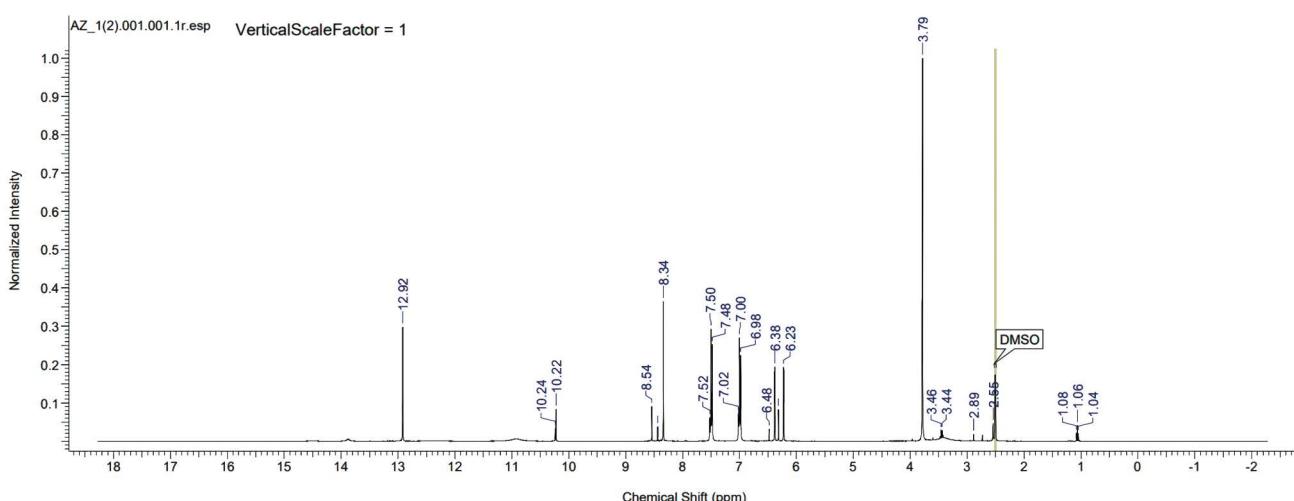


Рисунок 14. Спектр ЯМР ¹Н биочанина А (промежуточного продукта синтеза генистеина)

Figure 14. ¹H NMR spectrum of biochanin A (the synthesis intermediate of genistein)

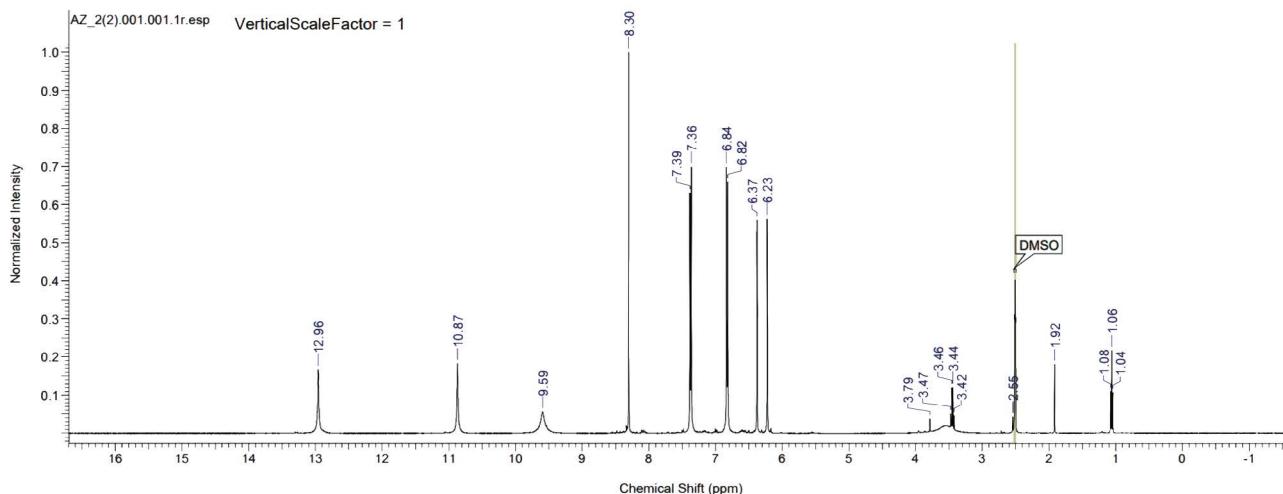


Рисунок 15. Спектр ЯМР ^1H генистеина «технического», синтезированный на кафедре ХТЛВ СПХФУ (образец № 2)

Figure 15. ^1H NMR spectrum of genistein synthesized at the departments of chemical technology of medicinal substances, SPCPU (sample № 2)

ную документацию на стандартный образец генистеина, что в дальнейшем позволит проводить контроль качества лекарственных средств на его основе и выявлять недоброкачественные БАД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wise S. A. What is novel about certified reference materials? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018;410:2045–2049. DOI: 10.1007/s00216-018-0916-y.
2. Абрамова Е. Г., Лобовикова О. А., Шульгина И. В., Комиссаров А. В., Савицкая Л. В., Генералов С. В., Галкина М. В., Гаврилова Ю. К., Кочкин А. В., Никифоров А. К. Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):160–164.
3. Шведова Е. В., Устинникова О. Б., Рунова О. Б., Волкова Р. А., Бондарев В. П., Смолов М. А., Шукров Р. Р., Вишневский А. Ю. Разработка порядка аттестации стандартного образца рекомен-

бинантного активированного фактора свертывания крови VII для подтверждения подлинности методом пептидного картирования, включающего масс-спектрометрическое исследование первичной структуры. *Гематология и трансфузиология*. 2018;63(4):334–342. DOI: 10.25837/HAT.2019.68.74.002.

4. Меркулов В. А., Саканян Е. И., Климов В. И., Шемерянкина Т. Б., Яшкир В. А., Бармин А. В. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(11):54–56. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-11-54-56.
5. Громова А. В. Проблемы перевода фармацевтической терминологии. Понимание и рефлексия в коммуникации, культуре и образовании. Сборник статей Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции, посвящённой памяти заслуженного деятеля науки, профессора, доктора филологических наук Георгия Исаевича Богина; 2018 12–23 октября; Тверь, Россия. Тверь: ТвГУ; 2019. С. 100–105.
6. ISO GUIDE 35:2017 Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability – 4th ed. – 01.08.2017. Available at: <https://www.iso.org/ru/standard/60281.html>. Available at: 02.09.2021.

Таблица 2. Спектральные характеристики генистеина для нормативной документации

Table 2. The spectrum characteristics of genistein for regulatory documents

Вид спектра Spectrum type	Основные характеристики Main characteristics	Группы Groups
ЯМР ^1H NMR ^1H	8,31 дуплеты doublets 6,81; 6,83 7,39 6,23 6,38 12,96 10,89	протон в положении 2 кольца С proton in position 2 of ring C протоны в положениях 3', 5' и 7,37 protons in positions 3', 5' and 7.37 2', 6' кольца В 2', 6' B rings протона 6 положения А proton 6 position A протона 8 положения кольца А proton 8 position of ring A –OH группы 5 положения А –OH group 5 position A –OH 7 положения кольца А –OH 7 position of ring A

Вид спектра Spectrum type	Основные характеристики Main characteristics	Группы Groups
ЯМР ^{13}C NMR ^{13}C	154,46 + 154,40 122,74 180,68 104,92 162,46 99,37 + 99,47 164,73 94,07 + 94,18 158,05 121,67 130,63 115,52 157,87	СН-группа в положении 2 CH group at position 2 С в положении 3 C in position 3 С в положении 4 C in position 4 С в положении 10 C in position 10 С в положении 5 C in position 5 СН-группа в положении 6 CH group at position 6 С в положении 7 C in position 7 СН-группа в положении 8 CH group at position 8 С в положении 9 C in position 9 С в положении 1' C in position 1' СН-группы в положениях 2', 6' CH groups in positions 2', 6' СН-группы в положениях 3', 5' CH groups in positions 3', 5' С в положении 4' C in position 4'
ИК-спектроскопия IR spectroscopy	3412 cm^{-1} «зона отпечатков пальцев» (от 1600 до 400 nm^{-1}): 1583 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 810 cm^{-1} , 819 cm^{-1} , 841 cm^{-1} , 852 cm^{-1} , 1201 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} 3412 cm^{-1} "Fingerprint zone" (1600 to 400 nm^{-1}): 1583 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 810 cm^{-1} , 819 cm^{-1} , 841 cm^{-1} , 852 cm^{-1} , 1201 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1365 cm^{-1}	наличии внутримолекулярной водородной связи между ОН-группой в 5 и С=О группой в 4 положении the presence of an intramolecular hydrogen bond between the OH group in the 5 and C=O group in the 4 position
Рамановская спектроскопия Raman spectroscopy	74,6 cm^{-1} , 95,9 cm^{-1} , 105,6 cm^{-1} , 117,1 cm^{-1} , 304,4 cm^{-1} , 378,1 cm^{-1} , 401,8 cm^{-1} , 416,4 cm^{-1} , 789,9 cm^{-1} , 886,2 cm^{-1} , 986,9 cm^{-1} , 1615,6 cm^{-1} 74,6 cm^{-1} , 95,9 cm^{-1} , 105,6 cm^{-1} , 117,1 cm^{-1} , 304,4 cm^{-1} , 378,1 cm^{-1} , 401,8 cm^{-1} , 416,4 cm^{-1} , 789,9 cm^{-1} , 886,2 cm^{-1} , 986,9 cm^{-1} , 1615,6 cm^{-1}	Полосы, отвечающие за подтверждение индивидуальной молекулы Bands responsible for confirmation of an individual molecule

- Леонтьев Д. А., Подпружников Ю. В., Воловик Н. В. Роль стандартных образцов в обеспечении качества лекарственных средств: регуляторные и метрологические аспекты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;3(16):180–187.
- Щепочкина О. Ю., Гегечкори В. И., Прокофьева В. И., Чепило Д. А., Левко А. А., Чадова Н. Н., Шестаков В. Н. Современные подходы к разработке стандартных образцов лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(7):49–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.
- Кузьмина Н. Е., Моисеев С. В., Крылов В. И., Яшкир В. А., Меркулов В. А. Разработка методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции «бусерелина ацетат» методом ЯМР спектроскопии без использования фармакопейного стандартного образца. *Антибиотики и химиотерапия*. 2017;62(9–10):40–46.
- Зверев Я. Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):181–194. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
- Зверев Я. Ф. Антитромбоцитарная активность флавоноидов. *Вопросы питания*. 2017;86(6):6–20.
- Thangavel P, Puga-Olgún A., Rodríguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):3892. DOI: 10.3390/molecules24213892.
- Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badrudddeen, Ahsan F. An overview on genistein and its various formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
- Петибская В. С., Лукомец В. М., ред. СОЯ: Химический состав и использование. Майкоп: ОАО Полиграф-ЮГ; 2012. 432 с.
- Стрелова О. Ю., Волкова К. В., Гребенюк А. Н., Теслов Л. С. Оценка показателей качества перспективной фармацевтической субстанции на основе синтетического генистеина. *Бутлеровские сообщения*. 2016;48(12):94–101.
- Брайан Б. А., Оллред М. К. Способы получения экстракта, обогащенного изофлавоновыми агликонами, из растительного материала (варианты), способ извлечения материала с высоким содержанием генистеина или дайдзеина из обогащенного изофлавоновыми агликонами материала. Патент РФ на изобретение № RU 2152434 C1. 10.07.2000. Доступно по: <https://patenton.ru/patent/RU2152434C1>. Ссылка активна на 02.11.2021.

17. Чикунов И. Е. Отчет о научно-исследовательской работе по теме Генистейн. Химки: ФМБА НПЦ «ФАРМЗАЩИТА»; 2012. 22 с.
18. Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Шпрах З. С., Будько А. П., Экторва Л. В., Козин Д. А., Решетняк В. Ю., Нестерова О. В., Панкратова Е. А. Стандартизация фармацевтической субстанции препарата ЛХС-1208. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):88–94. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-88-94.
19. Mrug G. P., Bondarenko S. P., Khilya V. P., Frasinyuk M. S. Synthesis and aminomethylation of 7-hydroxy-5-methoxyisoflavones. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013;49(2):235–241. DOI: 10.1007/s10600-013-0570-8.
20. Jeffrey D. St. D., Gordon J. S., Carroll V. M., Priefer R. Novel synthesis of the isoflavone genistein. *Synthesis*. 2010;10:1590–1592. DOI: 10.1055/s-0029-1219757.
10. Zverev Y. F. Antitumor activity of flavonoids. *Bulleten' sibirskoj mediciny* = *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):181–194. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
11. Zverev Ya. F. Antiplatelet activity of flavonoids. *Voprosy pitanija= Problems of Nutrition*. 2017;86(6):6–20. (In Russ.)
12. Thangavel P., Puga-Olguin A., Rodriguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):3892. DOI: 10.3390/molecules24213892.
13. Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badruddin, Ahsan F. An overview on genistein and its various formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
14. Petibskaja V. S., Lukomec V. M., editors. *SOJa: Himicheskij sostav i ispol'zovanie* [SOJ: Chemical Composition and Uses]. Majkop: Poligraf-JuG; 2012. 432 p. (In Russ.)
15. Strelova O. Yu., Volkova K. V., Teslov L. S., Grebenyuk A. N. Evaluation of the quality indicators of promising pharmaceutical substance based on synthetic genistein. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2016;48(12):94–101. (In Russ.)
16. Brajan B. A., Ollred M. K. *Sposoby polucheniya ekstrakta, obogashchennogo izoflavonovymi aglikonami, iz rastitel'nogo materiala (variants)*, sposob izvlecheniya materiala s vysokim soderzhaniem genisteina ili daidzeina iz obogashchennogo izoflavonovymi aglikonami materiala [Protein tekhnolodzhiz internehshnl, Ink., assignee. Method of preparing extract enriched with isoflavone glycosides from plant material (variants), method of extraction of material with high content of genistein or daidzein from material enriched with isoflavone glycosides]. Patent RUS № 2152434 C1. 10.07.2000. Accessed: <https://patenton.ru/patent/RU2152434C1>. Available at: 02.11.2021. (In Russ.)
17. Chikunov I. E. *Otchet o nauchno-issledovatel'skoj rabote po teme Genistein* [Genistein Research Report]. Himki: FMBA NPC «FARM-ZASHHITA»; 2012. 22 p. (In Russ.)
18. Ignateva E. V., Yartseva I. V., Shprakh Z. S., Bud'ko A. P., Ektova L. V., Kozin D. A., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Pankratova E. A. Standardization of the pharmaceutical substance of the drug LCS-1208. *Razrabotka i registraciya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):88–94. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-88-94.
19. Mrug G. P., Bondarenko S. P., Khilya V. P., Frasinyuk M. S. Synthesis and aminomethylation of 7-hydroxy-5-methoxyisoflavones. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013;49(2):235–241. DOI: 10.1007/s10600-013-0570-8.
20. Jeffrey D. St. D., Gordon J. S., Carroll V. M., Priefer R. Novel synthesis of the isoflavone genistein. *Synthesis*. 2010;10:1590–1592. DOI: 10.1055/s-0029-1219757.

REFERENCE

1. Wise S. A. What is novel about certified reference materials? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018;410:2045–2049. DOI: 10.1007/s00216-018-0916-y.
2. Abramova E. G., Lobovikova O. A., Shulgina I. V., Komissarov A. V., Savitskaya L. V., Generalov S. V., Galkina M. V., Gavrilova Yu. K., Kochkin A. V., Nikiforov A. K. Development of quality control sample to assess specific activity of anti-rabies immunoglobulin obtained from equine blood serum. *Razrabotka i registraciya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;4(160–164. (In Russ.).
3. Shvedova E. V., Ustinnikova O. B., Rounova O. B., Volkova R. A., Bondarev V. P., Smolov M. A., Shukurov R. R., Vishnevskiy A. Yu. The development of industry standard sample qualification procedure of recombinant activated blood clotting factor VII for the proving of identity by peptide mapping method, including mass-spectrometric determination of the primary structure. *Gematologiya i Transfuziologiya = Hematology and Transfusion*. 2018;63(4):334–342. (In Russ.) DOI: 10.25837/HAT.2019.68.74.002.
4. Merkulov V. A., Sakanyan E. I., Klimov V. I., Shemeryankina T. B., Yashkir V. A., Barmin A. V. Modern approaches to development of reference substances for evaluation of the quality of pharmaceuticals. *Himiko-farmacevticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(11):54–56. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-11-54-56.
5. Gromova A. V. *Problemy perevoda farmacevticheskoy terminologii. Ponimanie i refleksija v kommunikacii, kul'ture i obrazovanii. Sbornik statej Vserossijskoj (s mezdunarodnym uchastiem) nauchno-prakticheskoy konferencii, posvjashchenoj pamjati zasluzhennogo dejatelja nauki, professora, doktora filologicheskikh nauk Georgija Isaevicha Bogina* [Problems of translation of pharmaceutical terminology. Understanding and reflection in communication, culture and education. Collection of articles of the All-Russian (with international participation) scientific and practical conference dedicated to the memory of Honored Scientist, Professor, Doctor of Philology Georgy Isayevich Bogin]; 2018 Oct. 12–23. Tver': TGU; 2019. P. 100–105.
6. ISO GUIDE 35:2017 Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability – 4th ed. – 01.08.2017. Available at: <https://www.iso.org/ru/standard/60281.html>. Available at: 02.09.2021.
7. Leontiev D. A., Podpruzhnikov Y. V., Volovyk N. V. The role of reference standards in quality assurance for medicines: regulatory and metrological aspects. *Razrabotka i registraciya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;3(16):180–187. (In Russ.)
8. Shchepochkina O. Y., Gegechkori V. I., Prokof'eva V. I., Chepilo D. A., Levko A. A., Chadova N. N., Shestakov V. N. Modern approaches to the development of standard samples of drugs. *Himiko-farmacevticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(7):761–765. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.
9. Kuzmina N. E., Moiseev S. V., Krylov V. I., Yashkir V. A., Merkulov V. A. Development of a procedure for identification of pharmaceutical substance «Buserelin Acetate» by NMR Spectroscopy without using pharmacopeia reference standart. *Antibiotiki i himioterapija*. 2017;62(9–10):40–46. (In Russ.)
10. Zverev Y. F. Antitumor activity of flavonoids. *Bulleten' sibirskoj mediciny* = *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):181–194. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
11. Zverev Ya. F. Antiplatelet activity of flavonoids. *Voprosy pitanija= Problems of Nutrition*. 2017;86(6):6–20. (In Russ.)
12. Thangavel P., Puga-Olguin A., Rodriguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):3892. DOI: 10.3390/molecules24213892.
13. Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badruddin, Ahsan F. An overview on genistein and its various formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
14. Petibskaja V. S., Lukomec V. M., editors. *SOJa: Himicheskij sostav i ispol'zovanie* [SOJ: Chemical Composition and Uses]. Majkop: Poligraf-JuG; 2012. 432 p. (In Russ.)
15. Strelova O. Yu., Volkova K. V., Teslov L. S., Grebenyuk A. N. Evaluation of the quality indicators of promising pharmaceutical substance based on synthetic genistein. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2016;48(12):94–101. (In Russ.)
16. Brajan B. A., Ollred M. K. *Sposoby polucheniya ekstrakta, obogashchennogo izoflavonovymi aglikonami, iz rastitel'nogo materiala (variants)*, sposob izvlecheniya materiala s vysokim soderzhaniem genisteina ili daidzeina iz obogashchennogo izoflavonovymi aglikonami materiala [Protein tekhnolodzhiz internehshnl, Ink., assignee. Method of preparing extract enriched with isoflavone glycosides from plant material (variants), method of extraction of material with high content of genistein or daidzein from material enriched with isoflavone glycosides]. Patent RUS № 2152434 C1. 10.07.2000. Accessed: <https://patenton.ru/patent/RU2152434C1>. Available at: 02.11.2021. (In Russ.)
17. Chikunov I. E. *Otchet o nauchno-issledovatel'skoj rabote po teme Genistein* [Genistein Research Report]. Himki: FMBA NPC «FARM-ZASHHITA»; 2012. 22 p. (In Russ.)
18. Ignateva E. V., Yartseva I. V., Shprakh Z. S., Bud'ko A. P., Ektova L. V., Kozin D. A., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Pankratova E. A. Standardization of the pharmaceutical substance of the drug LCS-1208. *Razrabotka i registraciya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):88–94. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-88-94.
19. Mrug G. P., Bondarenko S. P., Khilya V. P., Frasinyuk M. S. Synthesis and aminomethylation of 7-hydroxy-5-methoxyisoflavones. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013;49(2):235–241. DOI: 10.1007/s10600-013-0570-8.
20. Jeffrey D. St. D., Gordon J. S., Carroll V. M., Priefer R. Novel synthesis of the isoflavone genistein. *Synthesis*. 2010;10:1590–1592. DOI: 10.1055/s-0029-1219757.



Лекарственная флора Среднего Урала – перспективный источник получения лекарственных средств

А. Ю. Турышев^{1*}, В. Д. Белоногова¹, А. А. Орлова², К. О. Сидоров², А. Ю. Скорнякова³

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

³ ФГБОУ ВО «Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет» Министерства просвещения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Сибирская, д. 24

*Контактное лицо: Турышев Алексей Юрьевич. E-mail: aleksej2@mail.ru

ORCID: А. Ю. Турышев – <https://orcid.org/0000-0003-3867-5305>; В. Д. Белоногова – <https://orcid.org/0000-0001-8414-4367>; А. А. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-7836-5785>; К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; А. Ю. Скорнякова – <https://orcid.org/0000-0002-6141-6785>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 25.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Лекарственное растительное сырьё – один из важнейших источников фитопрепаратов, используемых как для профилактики, так и для лечения целого ряда заболеваний [1, 2]. Даже с развитием современной науки и химии, лекарственное растительное сырьё широко используется как в народной, так и в официальной медицине. Преимуществом лекарственных растений является их широкий спектр биологической активности, малая токсичность и возможность длительного применения без существенных побочных явлений. Хозяйственная деятельность человека оказывает заметное отрицательное влияние на состояние дикорастущих растений: запасы их сокращаются, а некоторые виды исчезают совсем. На сегодняшний день, учитывая высокий уровень развития промышленности и сельского хозяйства, заготовка сырья дикорастущих лекарственных растений не всегда бывает возможна. Информация о количественной оценке сырьевой базы дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала, содержании биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье частично устарела, что определяет необходимость их системного ресурсоведческого и химико-фармакогностического изучения.

Цель. Комплексная оценка состояния популяций дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала.

Материалы и методы. Определение запасов сырья изучаемых видов лекарственных растений проводили на конкретных зарослях по общепринятой методике. Подлинность сырья устанавливали макроскопическим методом при сборе образцов сырья. В ходе исследования заготовлены образцы лекарственного растительного сырья 5 видов. Определение и оценку основных показателей доброкачественности лекарственного растительного сырья (содержание действующих и экстрактивных веществ, влажности в массе при высушивании, золы общей и золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной) проводили по методикам и требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIV издания. В сырье *Artemisiae absinthii herba* и *Leonuri herba* проводили определение суммы экстрактивных веществ гравиметрическим методом. Количественную оценку содержания эфирного масла в образцах *Origanum vulgare herba* и *Tanacetum vulgare flores* проводили методом гидродистилляции [1]. Для определения количественного содержания суммы флавоноидов в *Hyperici herba*, *Artemisiae absinthii herba*, *Leonuri herba* и суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в *Tanacetum vulgare flores* использовали спектрофотометрический метод [2].

Результаты и обсуждение. В ходе ресурсоведческих и фитохимических исследований представителей лекарственной флоры Среднего Урала проведена комплексная оценка состояния популяций дикорастущих лекарственных растений – источников лекарственного растительного сырья (*Origanum vulgare herba*, *Hyperici herba*, *Tanacetum vulgare flores*, *Artemisiae absinthii herba* и *Leonuri herba*). Результаты включены в электронный кадастр дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала.

Заключение. Проведенный комплекс исследований позволит актуализировать информацию о лекарственной флоре Среднего Урала с целью создания лекарственных средств на основе природного сырья.

Ключевые слова: лекарственные растения, Средний Урал, лекарственное растительное сырьё, географические информационные системы

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

Вклад авторов. Все авторы в равной степени участвовали в исследовательской работе, обобщении научной литературы, обсуждении и написании текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Турышев А. Ю., Белоногова В. Д., Орлова А. А., Сидоров К. О., Скорнякова А. Ю. Лекарственная флора Среднего Урала – перспективный источник получения лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):32–36. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-32-36](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-32-36)

Medicinal Flora of the Middle Urals – a Prospective Source of Obtaining Medicines

Aleksey Yu. Turyshев^{1*}, Valentina D. Belonogova¹, Anastasia A. Orlova², Kirill O. Sidorov², Anna Yu. Skornyakova³

¹ Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya Str., Perm, 614990, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Perm State Humanitarian Pedagogical University», 21, Siberian Str., Perm, 614990, Russia

*Corresponding author: Aleksey Yu. Turyshev. E-mail: aleksej2@mail.ru

ORCID: Aleksey Yu. Turyshev – <https://orcid.org/0000-0003-3867-5305>; Valentina D. Belonogova – <https://orcid.org/0000-0001-8414-4367>;
Anastasia A. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-7836-5785>; Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; Anna Yu. Skornyakova – <https://orcid.org/0000-0002-6141-6785>.

Received: 20.10.2021

Revised: 25.11.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Medicinal plant raw materials are one of the most important sources of herbal remedies used both for the prevention and treatment of a number of diseases [1, 2]. Even with the development of modern science and chemistry, medicinal plant raw materials are widely used in both folk and official medicine. The advantage of medicinal plants is their wide range of biological activity, low toxicity and the possibility of long-term use without significant side effects. Human economic activity has a noticeable negative effect on the condition of wild-growing plants: their stocks are decreasing, and some species disappear altogether. Today, given the high level of development of industry and agriculture, the procurement of raw materials for wild medicinal plants is not always possible. Information on the quantitative assessment of the raw material base of wild medicinal plants in the Middle Urals, the content of biologically active substances in medicinal plant raw materials is partially outdated, which determines the need for their systemic resource study and chemical-pharmacognostic study.

Aim. Comprehensive assessment of the state of populations of wild medicinal plants in the Middle Urals.

Materials and methods. Determination of stocks of raw materials of the studied species of medicinal plants was carried out on specific thickets according to the generally accepted method. The authenticity of the raw materials was established by a macroscopic method when collecting raw material samples. In the course of the study, samples of medicinal plant materials of 5 types were prepared. The determination and assessment of the main indicators of the good quality of medicinal plant raw materials (the content of active and extractive substances, moisture in the mass upon drying, total ash and ash insoluble in a 10% solution of hydrochloric acid) was carried out according to the methods and requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. In the raw materials *Artemisiae absinthii herba* and *Leonuri herba*, the amount of extractives was determined by the gravimetric method. The quantitative assessment of the content of essential oil in the samples of *Origani vulgaris herba* and *Tanaceti vulgaris flores* was carried out by the method of hydrodistillation. To determine the quantitative content of the sum of flavonoids in *Hyperici herba*, *Artemisiae absinthii herba*, *Leonuri herba* and the sum of flavonoids and phenolcarboxylic acids in *Tanaceti vulgaris flores*, a spectrophotometric method was used.

Results and discussion. In the course of resource and phytochemical studies of representatives of the medicinal flora of the Middle Urals, a comprehensive assessment of the state of populations of wild medicinal plants – sources of medicinal plant raw materials (*Origani vulgaris herba*, *Hyperici herba*, *Tanaceti vulgaris flores*, *Artemisiae absinthii herba* and *Leonuri herba*) was carried out. The results are included in the electronic inventory of wild medicinal plants of the Middle Urals.

Conclusion. The conducted complex of studies will allow updating information about the medicinal flora of the Middle Urals in order to use raw materials for the creation of medicines.

Keywords: medicinal plants, the Middle Urals, medicinal plant raw materials, geographical information systems

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. All authors equally participated in research work, generalization of scientific literature, discussion and writing of the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Turyshev A. Y., Belonogova V. D., Orlova A. A., Sidorov K. O., Skornyakova A. Y. Medicinal flora of the Middle Urals – a prospective source of obtaining medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):32-36. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-32-36](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-32-36)

ВВЕДЕНИЕ

Обеспеченность страны природными ресурсами – один из важнейших факторов развития национального хозяйства и залог экономического роста страны. Структура природных ресурсов, величина их запасов, качество, степень изученности и направления хозяйственного освоения оказывают непосредственное влияние на экономический потенциал. Рост производственного потенциала страны и увеличение разносторонних потребностей общества настоятельно требуют изучения закономерностей территориального распределения и оценки природных ресурсов. Одним из видов природных ресурсов, требующих постоянного контроля за состоянием популяций являются лекарственные растения [3].

Информация о количественной оценке сырьевой базы дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала, содержании биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье частично устарела в связи с увеличивающейся антропогенной нагрузкой на окружающую среду, хозяйственное освоение и использование территорий, что определяет необходимость их системного ресурсоведческого и химико-фармакогностического изучения [4–8].

Согласно литературным данным и собственным наблюдениям на территории Среднего Урала производится около 100 видов официальных лекарственных растений, что составляет всего лишь 6 % от общей флоры [9].

В зависимости от условий произрастания лекарственных растений (ЛР), их встречаемости и востребованности, стратегия и тактика проведения «инвентаризационных» ресурсоведческих работ может быть различна [10].

Такие виды как одуванчик лекарственный, горец птичий, подорожник большой, пихта сибирская, сосна лесная, ель европейская, береза, липа сердцевидная и другие древесные породы, произрастают повсеместно и в больших количествах. Оценку запасов сырья этих ЛР на наш взгляд проводить нецелесообразно.

В то же время для многих представителей лесной, луговой и сорной флоры, таких как душица обыкновенная, зверобой продырявленный и з. пятнистый, полынь горькая, пустырник пятнистолистный, и ряда других видов необходимо как можно чаще отслеживать состояние зарослей ввиду увеличивающейся антропогенной нагрузки на окружающую среду и хозяйственного освоения и использования территорий. Именно они и представляют интерес для комплексной оценки состояния популяций

Цель исследования: комплексная оценка состояния популяций некоторых видов лекарственных растений на территории Среднего Урала

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовались лекарственные растения *Origanum vulgare* L., *Hypericum perforatum* L., *Hypericum maculatum* Crantz., *Tanacetum vulgare* L., *Artemisia absinthium* L., *Leonurus quinquelobatus* Gilib., и лекарственное растительное сырье *Origani vulgaris herba*, *Hyperici herba*, *Tanaceti vulgaris flores*, *Artemisiae absinthii herba* и *Leonuri herba*, заготовленное летом 2019–2021 гг. на территории Пермского края и Свердловской области, после чего сырьё было подвергнуто первичной обработке и высушило воздушно-теневым способом.

Определение запасов сырья изучаемых видов ЛР проводили на конкретных зарослях по общепринятой методике. Подлинность сырья устанавливали макроскопически при сборе образцов сырья.

Определение и оценку основных показателей доброкачественности лекарственного растительного сы-

ря (содержание действующих и экстрактивных веществ, влажности в массе при высыпывании, золы общей и золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной) проводили по методикам и требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIV издания. В сырье пустырника и полыни горькой проводили определение суммы экстрактивных веществ гравиметрическим методом [11]. Количественную оценку содержания эфирного масла в образцах травы душицы и цветков пижмы проводили методом гидродистилляции [11].

Для определения количественного содержания суммы флавоноидов в траве зверобоя и цветках пижмы использовали спектрофотометрический метод [11].

Оценку микробиологической чистоты сырья проводили по методике ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» [11].

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе была проведена оценка запасов лекарственного растительного сырья на территории Среднего Урала. В ходе исследования установлены площадь зарослей (S, га) и возможный объем ежегодной заготовки (ВОЕЗ, кг).

Результаты представлены в таблице 1.

Установлено, что обследованные регионы обладают значительными запасами сырья исследованных видов.

Следующий этап исследования был посвящен оценке содержания биологически активных веществ в образцах сырья.

В образцах душицы обыкновенной травы и полыни горькой травы определяли содержание эфирного масла методом гидродистилляции.

В образцах зверобоя травы и пижмы цветков определяли содержание флавоноидов спектрофотометрическим методом.

В образцах пустырника травы и полыни горькой травы определяли содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70 % этанолом.

Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1. Результаты ресурсоведческого исследования некоторых представителей лекарственной флоры Среднего Урала

Table 1. The results of a resource-based study of some representatives of the medicinal flora of the Middle Urals

№ п/п № р/р	Лекарственное растительное сырье Medicinal plant raw material	Пермский край Perm Territory		Свердловская область Sverdlovsk Region		Средний Урал Middle Urals	
		S, га S, ha	ВОЕЗ, кг Possible volume of annual procurement, kg	S, га S, ha	ВОЕЗ, кг Possible volume of annual procurement, kg	S, га S, ha	ВОЕЗ, кг Possible volume of annual procurement, kg
1	<i>Origani vulgaris herba</i>	298,4	4591,3	102,3	2783,1	400,7	7374,4
2	<i>Hyperici herba</i> ,	414,8	7438,1	365,3	6343,2	780,1	13781,3
3	<i>Tanaceti vulgaris flores</i>	137,1	4351,0	153	4417,2	290,1	8768,2
4	<i>Artemisiae absinthii herba</i>	419,1	17342,2	379,1	15678,6	798,2	33020,8
5	<i>Leonuri herba</i>	98,12	3012,1	54,2	1581,1	152,32	4593,2

Таблица 2. Результаты оценки содержания биологически активных и экстрактивных веществ в образцах сырья

Table 2. The results of the assessment of the content of biologically active and extractive substances in the samples of raw materials

№ п/п № p/p	Лекарственное растительное сырье Medicinal plant raw material	Содержание действующих веществ, % Content of active compounds, %	
		Пермский край Perm Territory	Свердловская область Sverdlovsk Region
1	<i>Origani vulgaris herba</i>	Содержание эфирного масла от $0,24 \pm 0,02$ до $0,44 \pm 0,03$ Essential oil content from $0,24 \pm 0,02$ to $0,44 \pm 0,03$	Содержание эфирного масла от $0,33 \pm 0,02$ до $0,47 \pm 0,02$ Essential oil content from $0,33 \pm 0,02$ to $0,47 \pm 0,02$
2	<i>Hyperici herba</i>	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин от $2,18 \pm 0,01$ до $5,08 \pm 0,04$ Flavonoid content in terms of rutin from $2,18 \pm 0,01$ to $5,08 \pm 0,04$	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин от $3,05 \pm 0,02$ до $7,22 \pm 0,52$ Flavonoid content in terms of rutin from $3,05 \pm 0,02$ to $7,22 \pm 0,52$
3	<i>Tanaceti vulgaris flores</i>	Содержание флавоноидов и фанолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин от $2,61 \pm 0,08$ до $3,01 \pm 0,08$ The content of flavonoids and phanolcarboxylic acids in terms of luteolin from $2,61 \pm 0,08$ to $3,01 \pm 0,08$	Содержание флавоноидов и фанолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин от $2,73 \pm 0,07$ до $2,95 \pm 0,05$ The content of flavonoids and phanolcarboxylic acids in terms of luteolin from $2,61 \pm 0,08$ to $3,01 \pm 0,08$
4	<i>Artemisiae absinthii herba</i>	Содержание экстрактивных веществ от $27,53 \pm 1,12$ до $35,49 \pm 1,67$ Content of extractives from $27,53 \pm 1,12$ to $35,49 \pm 1,67$ Содержание эфирного масла от $0,37 \pm 0,03$ до $0,80 \pm 0,06$ Essential oil content from $0,37 \pm 0,03$ to $0,80 \pm 0,06$ Содержание флавоноидов в пересчете на рутин от $0,44 \pm 0,02$ до $0,47 \pm 0,02$ Flavonoid content in terms of rutin from $0,44 \pm 0,02$ to $0,47 \pm 0,02$	Содержание экстрактивных веществ от $26,33 \pm 0,78$ до $30,97 \pm 0,44$ Content of extractives from $26,33 \pm 0,78$ to $30,97 \pm 0,44$ Содержание эфирного масла от $0,30 \pm 0,02$ до $0,76 \pm 0,06$ Essential oil content from $0,30 \pm 0,02$ to $0,76 \pm 0,06$ Содержание флавоноидов в пересчете на рутин от $0,41 \pm 0,02$ до $0,51 \pm 0,02$ Flavonoid content in terms of rutin from $0,41 \pm 0,02$ to $0,51 \pm 0,02$
5	<i>Leonuri herba</i>	Содержание экстрактивных веществ от $25,72 \pm 1,41$ до $33,16 \pm 1,19$ Content of extractives from $25,72 \pm 1,41$ to $33,16 \pm 1,19$ Содержание флавоноидов в пересчете на рутин от $0,37 \pm 0,02$ до $0,48 \pm 0,02$ Flavonoid content in terms of rutin from $0,37 \pm 0,02$ to $0,48 \pm 0,02$	Содержание экстрактивных веществ от $26,31 \pm 1,12$ до $35,24 \pm 1,24$ Content of extractives from $26,31 \pm 1,12$ to $35,24 \pm 1,24$ Содержание флавоноидов в пересчете на рутин от $0,43 \pm 0,03$ до $0,45 \pm 0,02$ Flavonoid content in terms of rutin from $0,43 \pm 0,03$ to $0,45 \pm 0,02$

Установлено, что содержание биологически активных и экстрактивных веществ в образцах сырья соответствовало требованиям нормативной документации.

Таким образом, по результатам фитохимического исследования было установлено, что все образцы сырья удовлетворяют требованиям действующей нормативной документации.

В результате исследования разработан алгоритм создания и использования географической информационной системы, позволяющей проводить мониторинг состояния лекарственной флоры региона (рисунок 1) [12].

Результаты исследований использованы для наполнения электронного кадастра «Дикорастущие лекарственные растения Среднего Урала» на базе географической информационной системы [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований позволит актуализировать информацию о лекарственной флоре Среднего Урала с целью использования сырья для создания лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shakya A. K. Medicinal Plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*. 2016;4(4):59–64.
2. Hostettmann K., Marston A. Plants as a still unexploited source of new drugs. *Natural Product Communications*. 2007;3(8):1307–1315. DOI: 10.1177/1934578x0800300814.
3. Stržincová P., Ház A., Burčová Z., Feranc J., Kreps F., Ňurina I., Jablonský M. Spruce bark – a source of polyphenolic compounds: Optimizing the operating conditions of supercritical carbon dioxide extraction. *Molecules*. 2019;24(22):1–15. DOI: 10.3390/molecules24224049.



Рисунок 1. Алгоритм создания и использования географической информационной системы «Лекарственные растения»

Figure 1. Algorithm for the creation and use of the geographic information system "Medicinal plants"

4. P'yankov V. I., Yashkov M. Yu., Reshetova E. A., Gangardt A. A. Assimilate transport and partitioning in Middle Ural plants differing in their ecological strategies. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000;41(1):1–9.
5. Altieri M. A., Anderson M. K., Merrick, L. C. Peasant agriculture and the conservation of crop and wild plant resources. *Conservation Biology*. 1987;1(1):49–58. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1987.tb00008.x.
6. Grankina V. P., Savchenko T. I., Chankina O. V., Kovalskaya G. A., Kutzenogii K. P. Trace element composition of Ural licorice *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Fabaceae Family). *Contemporary Problems of Ecology*. 2009;2(4):396–399. DOI: 10.1134/s1995425509040158.
7. Usol'tsev V. A., Voronov M. P., Chasovskikh V. P. Net primary production of Ural forests: Methods and results of automated estimating. *Russian Journal of Ecology*. 2011;42(5):362–370. DOI: 10.1134/s1067413611050122.
8. Karimullina E., Antonova E., Pozolotina V. Assessing radiation exposure of herbaceous plant species at the East-Ural Radioactive Trace. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2008;124:113–120. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2013.04.003.
9. Belskii E., Belskaya E. Thermal effect of the Middle Ural copper smelter (Russia) and growth of birch leaves. *Environmental Science and Polluted Research*. 2021;28:26064–26072. DOI: 10.1007/s11356-020-12327-1.
10. Batsatsashvili K., Kikvidze Z., Bussmann R., eds. Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe. Ethnobotany of Mountain Regions. Springer Nature Switzerland AG; 2020. 1063 p. DOI: 10.1007/978-3-030-28940-9_1.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopeia.php>. Ссылка активна на 28.10.2021.
12. Турышев А. Ю. Методические подходы применения современных информационных технологий в лекарственном ресурсоведении. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;4:1–7.
3. Strižincová P., Ház A., Burčová Z., Feranc J., Kreps F., Ňurina I., Jablonský M. Spruce bark – a source of polyphenolic compounds: Optimizing the operating conditions of supercritical carbon dioxide extraction. *Molecules*. 2019;24(22):1–15. DOI: 10.3390/molecules24224049.
4. P'yankov V. I., Yashkov M. Yu., Reshetova E. A., Gangardt A. A. Assimilate transport and partitioning in Middle Ural plants differing in their ecological strategies. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000;41(1):1–9.
5. Altieri M. A., Anderson M. K., Merrick, L. C. Peasant agriculture and the conservation of crop and wild plant resources. *Conservation Biology*. 1987;1(1):49–58. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1987.tb00008.x.
6. Grankina V. P., Savchenko T. I., Chankina O. V., Kovalskaya G. A., Kutzenogii K. P. Trace element composition of Ural licorice *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Fabaceae Family). *Contemporary Problems of Ecology*. 2009;2(4):396–399. DOI: 10.1134/s1995425509040158.
7. Usol'tsev V. A., Voronov M. P., Chasovskikh V. P. Net primary production of Ural forests: Methods and results of automated estimating. *Russian Journal of Ecology*. 2011;42(5):362–370. DOI: 10.1134/s1067413611050122.
8. Karimullina E., Antonova E., Pozolotina V. Assessing radiation exposure of herbaceous plant species at the East-Ural Radioactive Trace. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2008;124:113–120. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2013.04.003.
9. Belskii E., Belskaya E. Thermal effect of the Middle Ural copper smelter (Russia) and growth of birch leaves. *Environmental Science and Polluted Research*. 2021;28:26064–26072. DOI: 10.1007/s11356-020-12327-1.
10. Batsatsashvili K., Kikvidze Z., Bussmann R., eds. Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe. Ethnobotany of Mountain Regions. Springer Nature Switzerland AG; 2020. 1063 p. DOI: 10.1007/978-3-030-28940-9_1.
11. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopeia.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
12. Turyshev A. Y. Methodological approaches to the application of modern information technologies in medicinal resource studies. *Modern problems of science and education*. 2015;4:1–7. (In Russ.)

REFERENCES

1. Shakya A. K. Medicinal Plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*. 2016;4(4):59–64.
2. Hostettmann K., Marston A. Plants as a still unexploited source of new drugs. *Natural Product Communications*. 2007;3(8):1307–1315. DOI: 10.1177/1934578x0800300814.



Разработка технологии и состава средства для полости рта на основе фитосубстанций

О. Н. Абросимова*, Н. С. Пивоварова¹, М. А. Буракова¹, Т. С. Шебитченко¹

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Абросимова Олеся Николаевна. E-mail: olesya.abrosimova@pharminnotech.com

ORCID: О. Н. Абросимова – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>; Н. С. Пивоварова – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; М. А. Буракова – <https://orcid.org/0000-0002-3880-0359>; Т. С. Шебитченко – <https://orcid.org/0000-0003-1423-4492>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 26.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Лечение и профилактика заболеваний слизистых полости рта одна из приоритетных задач в стоматологии. На практике при комплексном лечении воспалительно-деструктивных процессов часто применяют антибактериальные средства. Однако длительное, бесконтрольное применение таких средств приводит к многочисленным осложнениям: лекарственной толерантности, ослаблению лечебного эффекта, дисбактериозу полости рта и желудочно-кишечного тракта и др. Поэтому в настоящее время вопрос поиска альтернативы антибактериальной терапии остается открытым. В качестве альтернативы следует рассмотреть применение эффективных и безопасных лекарственных средств растительного происхождения, которые легко усваиваются, менее токсичны, практически не вызывают побочных явлений и аллергических реакций, обладают мягким, регулирующим и нормализующим действием.

Цель. Цель исследования – разработка состава и технологии гранул шипучих для приготовления раствора для полоскания полости рта на основе фитосубстанций.

Материалы и методы. Сухие экстракты получали из лекарственного растительного сырья (ЛРС): шалфея лекарственного листья, календулы лекарственной цветки, тысячелистника обыкновенного трава, кровохлебки лекарственной корневища и корни и астрагала шерстистоцветкового трава. В качестве вспомогательных веществ в технологии гранул использовали: натрий углекислый кислый, лимонную кислоту, безводную, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) – 90 (EMCOCEL®90M), повидон (Plasdone™ K-29/32) и стеарат кальция. В лабораторных условиях гранулы на основе фитоэкстрактов получали методом продавливания влажных масс. Числовые показатели ЛРС, технологические свойства сухих экстрактов (СЭ) и гранул, а также показатели качества гранул определяли по методикам, описанным в ГФ XIV.

Результаты и обсуждение. Определены числовые показатели ЛРС (измельченность сырья и содержание посторонних примесей, общая зола в ЛРС и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, влажность, содержание экстрактивных веществ) и подтверждена доброкачественность сырья, используемого на последующих этапах разработки лекарственного средства. Наработаны СЭ из каждого вида ЛРС и определены технологические свойства СЭ. Разработан состав и технология шипучих гранул методом продавливания влажных масс. Для улучшения сыпучести и снижения гигроскопичности гранулируемого материала в качестве наполнителя использовали МКЦ – 90 (EMCOCEL®90M). Для создания шипучей лекарственной формы в состав гранул вводили лимонную кислоту и натрия гидрокарбонат. Массу для гранулирования увлажняли 10 % спиртоводным раствором Plasdone™ K-29/32. Предложен проект спецификации показателей качества шипучих гранул на основе фитоэкстрактов.

Заключение. В ходе исследовательской работы определены числовые показатели ЛРС и подтверждено его качество, что позволило использовать его для дальнейшего получения СЭ. Выбраны условия экстрагирования для каждого вида сырья, наработаны СЭ и определены показатели качества в соответствии с требованиями ГФ XIV. Подобраны вспомогательные вещества с учетом свойств сухих экстрактов, разработан состав и технология шипучих гранул на основе фитоэкстрактов, предложен проект спецификации на шипучие гранулы в соответствии с требованиями ГФ XIV.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, сухие экстракты, шипучие гранулы, полоскание полости рта

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

Вклад авторов. О. Н. Абросимова, Н. С. Пивоварова, М. А. Буракова, Т. С. Шебитченко – постановка задачи, выполнение эксперимента, обработка полученных данных, обсуждение результатов и написание текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Абросимова О. Н., Пивоварова Н. С., Буракова М. А., Шебитченко Т. С. Разработка технологии и состава средства для полости рта на основе фитосубстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4-1):37–45. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-37-45](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45)

Development of Technology and Composition of the Medicinal Product for Oral Cavity Based on Phytosubstances

Olesya N. Abrosimova*, Nadezhda S. Pivovarova, Marina A. Burakova, Tatyana S. Shebitchenko

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Olesya N. Abrosimova. E-mail: olesya.abrosimova@pharminnotech.com

Abstract

Introduction. Treatment and prevention of diseases of the oral mucosa is one of the priority tasks in dentistry. In practice, antibacterial agents are often used in the complex treatment of inflammatory and destructive processes. However, long-term, uncontrolled usage of such drugs leads to numerous complications: drug tolerance, weakening of the therapeutic effect, dysbiosis of the oral cavity and gastrointestinal tract, etc. Therefore, at present, the question of search for alternative to antibiotic therapy remains open. As an alternative, it is necessary considering the usage of effective and safe herbal medicines that are easy to digest, less toxic, practically do not cause side effects and allergic reactions, and have a light regulating and normalizing effect.

Aim. The aim of the present study is to develop the composition and technology of effervescent granules for the preparation of a solution for rinsing the oral cavity based on phytosubstances.

Materials and methods. Dry extracts were obtained from medicinal plant materials: medicinal sage leaves, medicinal calendula flowers, yarrow herb, medicinal rhizomes and roots and astragalus woolly herb. Sodium carbonate, citric acid, anhydrous, microcrystalline cellulose – 90 (EMCOCEL®90M), povidone (Plasdone™ K-29/32) and calcium stearate were used as auxiliary substances in the granule technology. In laboratory conditions, granules based on phytoextracts were obtained by pressing wet masses. Numerical indicators of medicinal plant raw materials, technological properties of dry extracts and granules, as well as indicators of the quality of granules were determined according to the methods described in the State Pharmacopoeia XIV.

Results and discussion. The numerical indicators of medicinal plant raw materials (grinding of raw materials and the content of impurities, total ash in medicinal plant materials and ash insoluble in hydrochloric acid, humidity, content of extractives) were determined and the good quality of the raw materials used in the subsequent stages of drug development was confirmed. Dry extracts from each type of medicinal plant raw materials have been developed and the technological properties of dry extracts have been determined. The composition and technology of effervescent granules by pressing wet masses has been developed. To improve the flowability and reduce the hygroscopicity of the granulated material, microcrystalline cellulose – 90 (EMCOCEL®90M) was used as a filler. To create an effervescent dosage form, citric acid and sodium bicarbonate were added to the granules. The mass for granulation was moistened with a 10% alcohol-water solution of Plasdone™ K-29/32. A draft specification of quality indicators for effervescent granules based on phytoextracts is proposed.

Conclusion. In the course of the research work, the numerical indicators of medicinal plant raw materials were determined and its quality was confirmed, which made it possible to use it for further production of dry extracts. The extraction conditions were selected for each type of raw material, dry extracts were developed, and quality indicators were determined in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia XIV. Excipients were selected taking into account the properties of dry extracts, the composition and technology of effervescent granules based on phytoextracts was developed, a draft specification for effervescent granules was proposed in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia XIV.

Keywords: medicinal herbal raw materials, dry extracts, effervescent granules, mouthwash

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. Olesya N. Abrosimova, Nadezhda S. Pivovarova, Marina A. Burakova, Tatyana S. Shebitchenko – statement of the problem, implementation of the experiment, processing of obtained data, discussion of the results, and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Abrosimova O. N., Pivovarova N. S., Burakova M. A., Shebitchenko T. S. Development of technology and composition of the medicinal product for oral cavity based on phytosubstances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4–1):37–45. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-37-45](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45)

ВВЕДЕНИЕ

Лечение и профилактика заболеваний слизистых полости рта одна из приоритетных задач в стоматологии [1]. На практике при комплексном лечении воспалительно-деструктивных процессов часто применяют антибактериальные средства. Однако длительное, бесконтрольное применение таких средств приводит к многочисленным осложнениям: лекарственной толерантности, ослаблению лечебного эффекта, дисбактериозу полости рта и желудочно-кишечного тракта и др. Поэтому в настоящее время вопрос поиска альтернативы антибактериальной терапии остается открытым [2]. В качестве альтернативы стоит рассмотреть применение эффективных и безопасных лекарственных средств растительного происхождения,

которые легко усваиваются, менее токсичны, практически не вызывают побочных явлений и аллергических реакций, обладают мягким, регулирующим и нормализующим действием [3–9].

В пародонтологии для местного применения используют лекарственные средства в виде растворов для полоскания, эликсиров, спреев, мазей, паст, порошков, эмульсий, гелей, повязок. Также применяют клеевые и адгезивные композиции (пленки, нити, чипы). В состав таких средств включены вещества разных фармакологических групп. Среди них особое место занимают средства локальной доставки с prolongedным высвобождением лекарственных препаратов, которые обеспечивают длительное эффективное лечение на месте инфекции в гораздо меньших дозах [10]. Фармакологические свойства ле-

карственных средств растительного происхождения обусловлены наличием разнообразных биологически активных веществ (БАВ) [11].

На российском рынке представлен широкий выбор стоматологических фитопрепаратов, преимущественно в жидкой лекарственной форме [12]. Составы и фармакологическое действие наиболее востребованных препаратов отражены в таблице 1.

Жидкие лекарственные формы имеют такие недостатки [13], как нестабильность при хранении и сложности при транспортировке. Для устранения этих недостатков некоторые применяемые в жидким виде средства выпускают в виде таблеток, гранул, порошков, которые перед употреблением растворяют в воде. Рациональной лекарственной формой являются шипучие гранулы, обладающие высокой биодоступностью, точностью дозирования, стабильностью и

удобством в применении [14-20]. Поэтому представляет интерес разработка шипучих гранул на основе фитоэкстрактов для приготовления раствора для полоскания полости рта.

Цель исследования – разработка состава и технологии гранул шипучих для приготовления раствора для полоскания полости рта на основе фитоsubstанций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Шалфея лекарственного листья (ООО «Фармацевт», Россия), календулы лекарственной цветки (ООО «Фармацевт», Россия), тысячелистника обыкновенного трава (ООО «Фармацевт», Россия), кровохлебки лекарственной корневища и корни (ООО «Фармацевт», Россия), астрагала шерстистоцветкового трава (ООО «Лекра – СЭТ», Россия)), натрий

Таблица 1. Ассортимент фитопрепаратов для лечения заболеваний слизистой оболочки полости рта [12]

Table 1. An assortment of phytopreparations for the treatment of diseases of the oral mucosa [12]

Торговое название лекарственного средства Trade name of the medicinal product	Состав Composition	Основные фармакологические эффекты Main pharmacological effects
Мараславин Maraslavin	Отвары растительного сырья: травы полыни понтийской, травы чабреца, бутоны гвоздичного дерева, плоды черного перца, корневище зингибера, винный уксус Decoctions of herbal raw materials: herb wormwood, thyme herbs, clove buds, black pepper fruits, zingiber rhizome, wine vinegar	Противовоспалительное, кератопластическое, фибронизирующее, антипролиферативное действие. Используется для лечения гипертрофического гингвита и пародонтита. Anti-inflammatory, keratoplastic, fibronizing, antiproliferative action. It is used to treat hypertrophic gingivitis and periodontitis.
Ротокан Rotokan	Смесь жидких экстрактов цветков ромашки, цветков ноготков и травы тысячелистника A mixture of liquid extracts of chamomile flowers, marigold flowers and yarrow herb	Местное противовоспалительное, антисептическое, гемостатическое действие. Способствует регенерации поврежденной слизистой оболочки Local anti-inflammatory, antiseptic, hemostatic action. Promotes the regeneration of damaged mucous membranes
Стоматофит Stomatofit	Экстракт для местного применения (жидкий): корневища аира болотного, трава арники, кора дуба, листья мяты перечной, цветки ромашки аптечной, трава тимьяна обыкновенного, листья шалфея лекарственного Extract for local application (liquid): calamus rhizomes, arnica herb, oak bark, peppermint leaves, chamomile flowers, common thyme herb, sage leaves	Противовоспалительное действие. Лечение и профилактика гингвитов, пародонтитов и стоматитов Anti-inflammatory action. Treatment and prevention of gingivitis, periodontitis and stomatitis
Сальвин Salvin	Сальвина экстракта густого (Шалфея лекарственного листьев экстракт) Salvina extract thick (Salvia officinalis leaf extract)	Противоотечное и дубящее действие. Воспалительные заболевания полости рта, глотки, гортани Anti-edematous and tanning action. Inflammatory diseases of the oral cavity, pharynx, larynx
Сангвиритрин Sanguirithrin	Сумма дисульфатов алкалоидов травы маклеи сердце-видной сангвинарина и хелеритрина The sum of the disulfates of the alkaloids of the herb maclea heart-shaped sanguinarine and chelerythrine	Антибактериальное действие Antibacterial action
Хлорофиллит Chlorophyllipt	Смесь хлорофиллов листьев эвкалипта прутовидного A mixture of chlorophylls from eucalyptus leaf	Бактерицидное, противовирусное, противовоспалительное, противопротозойное и фунгицидное действия Bactericidal, antiviral, anti-inflammatory, antiprotozoal and fungicidal action
Ромазулан Romazulan	Экстракт и эфирное масло цветков ромашки Extract and essential oil of chamomile flowers	Противозудное, дезодорирующее, спазмолитическое, противомикробное, противовоспалительное действие Antipruritic, deodorant, antispasmodic, antimicrobial, anti-inflammatory action

углекислый кислый (х.ч., АО «ВЕКТОН», Россия), лимонная кислота, безводная (CAS № 77-92-9, АО «ВЕКТОН», Россия), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – 90 (EMCOCEL®90M, CAS № 9004-34-6, JRS Pharma GMBH&CO.KG, Германия), повидон (Plasdone™ K-29/32) (CAS № 9003-39-8, Ashland Inc., США), стеарат кальция (х.ч., ООО «Реактив», Россия).

Методы и оборудование

1. Товароведческий анализ лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Измельченность сырья и содержание посторонних примесей (электромагнитный ситовой шейкер RP-200-N (C.I.S.A., Испания)), общая зора в ЛРС (электропечь лабораторная муфельная LOIP LF-7/13-G1 (LOIP, Россия)), остаточная влажность (влагомер термогравиметрический инфракрасный MA-150 (SARTORIUS, Германия)), содержание экстрактивных веществ в ЛРС – определяли по методикам, описанным в ГФ XIV [21].

2. Разработка технологии фитоэкстрактов.

Для увеличения выхода БАВ для каждого вида сырья подобран экстрагент и метод экстрагирования. Параметры экстрагирования представлены в таблице 2.

Полученные извлечения сгущали, а затем досушивали в сушильном шкафу OF-12G (Jeio Tech, Корея) при температуре 55–60 °С до остаточной влажности не более 5 %, измельчали на мельнице лабораторной ЛМ 201 (Фирма «ПЛАУН-системы», Россия) до порошка, частицы которого проходят через сито с размером ячеек 355 мкм. В лабораторных условиях наработано по 5,0 г. сухого экстракта (СЭ) из каждого вида ЛРС.

3. Получение шипучих гранул в лабораторных условиях.

Сухой экстракты (СЭ) и вспомогательные вещества просеивали через сито с размером ячеек 0,5 мм. Компоненты, входящие в состав гранул, взвешивали на весах лабораторных СЕ 224 С с точностью 0,001 г. В лабораторном смесителе объемом 0,5 литра (Bosch GmbH, Германия) предварительно осуществляли смешение компонентов. Смесь порошков увлажняли 10 % спиртоводным раствором Plasdone™ K-29/32. Расход увлажнителя замеряли на весах лабораторных СЕ 224 С. Влажную массу гранулировали через сито-гранулятор с размером ячеек 2 мм, затем сушили до остаточной влажности 2 % в сушильном шкафу OF-12G при температуре 50–55 °С. Высушенный гранулят калибровали через сито с размером ячеек 1 мм. Лубрикант (стеарат кальция) просеивали через сито с размером ячеек 0,25 мм. Гранулят перемешивали с лубрикантом в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» в течение 5 минут. В лабораторных условиях наработано 50,0 г. гранул.

4. Исследование технологических свойств СЭ и гранул.

Технологические свойства СЭ и гранул: фракционный состав – ситовой анализ [электромагнитный ситовой шейкер RP 200N (CISA, Испания)], степень сыпучести и угол естественного откоса [тестер сыпучести GTL (ERWEKA, Германия)], насыпная плотность [тестер насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA, Германия)], прессуемость [тестер твердости таблеток TBN 125 TDP (ERWEKA, Германия)], остаточная влажность [влагомер термогравиметрический инфракрасный MA-150 (SARTORIUS, Германия)] – определяли по методикам, описанным в ГФ XIV [21].

Таблица 2. Параметры экстрагирования ЛРС

Table 2. Extraction parameters of medicinal plant materials

Вид ЛРС Type of medicinal plant raw materials	Гидромодуль Hydromodule	Экстрагент Extragent	Метод экстракции Extraction method
Шалфея лекарственного листья Sage officinalis leaves	1:8	спирт этиловый 50 % ethyl alcohol 50 %	Мацерация при нагревании (50–60 °C) в течение 1 ч Maceration with heating (50–60 °C) for 1 hour
Календулы лекарственной цветки Calendula officinalis flowers	1:20 1:15 1:15	горячая вода очищенная 70–80 °C purified hot water 70–80 °C	Трёхкратная мацерация с перемешиванием 100 об/мин 60 мин 30 мин 30 мин Triple maceration with stirring 100 rpm 60 min 30 min 30 min
Тысячелистника обыкновенного трава Yarrow herb	1:8	спирт этиловый 40 % ethyl alcohol 40 %	Мацерация при нагревании (50–60 °C) в течение 1 ч Maceration with heating (50–60 °C) for 1 hour
Кровохлёбки лекарственной корневища и корней Burnet of medicinal rhizome and roots	1:8	горячая вода очищенная 70–80 °C purified hot water 70–80°C	Мацерация с перемешиванием 100 об/мин в течение 1 ч maceration with stirring 100 rpm for 1 hour
Астрагала шерстистоцветкового травы Astragalus woolly herb	1:8	спирт этиловый 50 % ethyl alcohol 50 %	Мацерация при нагревании (50–60 °C) в течение 1 ч Maceration with heating (50–60 °C) for 1 hour

5. Исследование показателей качества гранул.

Проводили стандартизацию гранул в соответствии с требованиями ГФ XIV [21]: описание, цвет – визуальный метод, pH водного раствора – потенциометрический метод [рН-метр лабораторный РВ-11-Р11 (SARTORIUS, Германия)], распадаемость [тестер распадаемости таблеток ZT 322 m (ERWEKA, Германия)], растворение [тестер для определения показателя «Растворение» серии DT 820 (ERWEKA, Германия)].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования были определены числовые показатели (измельченность, содержание посторонних примесей, зола общая и не растворимая в хлористоводородной кислоте, влажность, экстрактивные вещества) выбранного ЛРС, с целью подтверждения доброкачественности. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3. Анализ числовых показателей в ЛРС

Table 3. Analysis of numerical indicators in medicinal plant raw materials

Показатель Index	Наименование сырья Name of raw materials				
	Шалфей лекарственного листья Sage officinalis leaves	Календула лекарственной цветки Calendula officinalis flowers	Тысячелистника обыкновенного трава Yarrow herb	Кровохлебки лекарственной корневища и корни Burnet of medicinal rhizome and roots	Астрагала шерстистоцветкового трава Astragalus woolly herb
Влажность, не более, % Humidity, no more %	10,3	8,7	8,2	8,9	8,3
Зола общая, не более, % Ash total, no more, %	8,7	10,0	12,4	10,7	6,7
Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте, не более % Ash insoluble in hydrochloric acid, no more than %	2,6	3,5	2,2	3,3	2,3
Измельченность сырья, % Grinding of raw materials, %	частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером: particles that do not pass through a sieve with holes of size				
	7 мм – 2,8 7 mm – 2.8	5 мм – 1,0 5 mm – 1.0	5 мм – 1,0 5 mm – 1.0	5 мм – 1,8 5 mm – 1.8	7 мм – 14,0 7 mm – 14.0
	частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером: particles passing through a sieve with holes of size				
	0,18 мм – 2,1 0.18 mm – 2.1	0,5 мм – 3,6 0.5 mm – 3.6	0,18 мм – 2,8 0.18mm – 2.8	0,5 мм – 3,0 0.5 mm – 3.0	0,5 мм – 8,0 0.5 mm – 8.0
Экстрактивные вещества, не менее, % Extractive substances, not less than, %	экстрагент extragent	спирт этиловый 50 % ethyl alcohol 50 %	вода очищенная purified water	вода очищенная purified water	спирт этиловый 50 % ethyl alcohol 50 %
	содержание content	40,5	35,8	21,6	20,1
Посторонние примеси Impurities					
Изменившие окраску (потемневшие и почерневшие) кусочки листьев, не более, % Pieces of leaves that have changed color (darkened and blackened), no more, %	2	не обнаружено not found	0,4	5	1
Другие части растения (цветки и кусочки стеблей), не более, % Other parts of the plant (flowers and pieces of stems), no more, %	5	0,4	не нормируется not standardized	0,5	не нормируется not standardized
Органическая примесь, не более, % Organic impurity, no more, %	не обнаружено not found				
Минеральная примесь, не более, % Mineral impurity, no more, %	не обнаружено not found				

Результаты, полученные в ходе определения числовых показателей подтверждают доброкачественность сырья, используемого на последующих этапах разработки лекарственного средства.

На втором этапе исследования были наработаны СЭ из каждого ЛРС, основные показатели качества экстрактов представлены в таблице 4.

Третий этап включал в себя разработку состава и технологии шипучих гранул на основе полученный СЭ.

При выборе методов получения гранул, а также при выборе вспомогательных веществ большое значение имеют технологические свойства порошкообразных лекарственных веществ. Поэтому необходимо было изучить технологические свойства СЭ. Результаты представлены в таблице 5.

Полученные данные свидетельствуют о том, что значения технологических характеристик СЭ соответствуют референтным значениям.

Для улучшения сыпучести и снижения гигроскопичности гранулируемого материала [22,23] в качестве наполнителя использовали МКЦ – 90 (EMCOCEL®90M). Для создания шипучей лекарственной формы в состав гранул вводили лимонную кислоту и натрия гид-

рокарбонат. Массу для гранулирования увлажняли 5 и 10 % спиртоводным раствором Plasdone™ K-29/32. Преимуществами использования Plasdone™ K-29/32 является легкая растворимость в воде и спирте, а также способность улучшать растворение и биодоступность лекарственных веществ за счет образования водорастворимых комплексов [24,25]. Гранулы, полученные с использованием 5 % спиртоводного раствора Plasdone™ K-29/32 требовали более длительного времени высушивания и оказались менее прочными. Более прочные гранулы получали путем увлажнения смеси для гранулирования 10 % спиртоводный раствор Plasdone™ K-29/32.

Для обеспечения фармакологического эффекта использовали смесь СЭ шалфея лекарственного, календулы лекарственной, тысячелистника обыкновенного, кровохлебки лекарственной, астрагала шерстистоцветкового в соотношении (1:1:1:1:1) соответственно. В таблице 6 приведен состав на одну дозу гранул (саше массой 5,0 г).

Проведен анализ гранул по показателям качества согласно ГФ XIV, спецификация шипучих гранул на основе фитоэкстрактов представлена в таблице 7.

Таблица 4. Основные показатели качества экстрактов

Table 4. The main indicators of the quality of extracts

Наименование Name	Показатель Index		
	Описание Description	Подлинность Authenticity	Потеря в массе при высушивании, % Weight loss on drying, %
СЭ Шалфея лекарственного листья Dry extract of salvia officinalis	Аморфный порошок от светло-коричневого с зеленоватым оттенком до коричневого, со специфическим запахом Amorphous powder from light brown with a greenish tint to brown, with a specific odor	Наличие эфирных масел и дубильных веществ The presence of essential oils and tannins	1,50 ± 0,08
СЭ Календулы лекарственной цветки Dry extract of calendula officinalis	Аморфный порошок от светло-коричневого цвета до коричневого, со специфическим запахом Amorphous powder from light brown to brown, with a specific odor	Наличие флавоноидов и тритерпеновых соединений Presence of flavonoids and triterpene compounds	1,00 ± 0,05
СЭ Тысячелистника обыкновенного Dry extract of yarrow	Мелкокристаллический порошок коричневого цвета с зеленоватым оттенком со специфическим запахом Fine crystalline brown powder with a greenish tint with a specific odor	Наличие эфирных масел The presence of essential oils	2,10 ± 0,10
СЭ Кровохлебки лекарственной корневища и корни Dry extract of medicinal burnet	Аморфный порошок от светло-коричневого с зеленоватым оттенком до коричневого, со специфическим запахом Amorphous powder from light brown with a greenish tint to brown, with a specific odor	Наличие дубильных веществ The presence of tannins	1,70 ± 0,09
СЭ Астрагала шерстистоцветкового травы Dry extract of astragalus woolly-flowered	Аморфный порошок от светло-коричневого с зеленоватым оттенком до коричневого, со специфическим запахом Amorphous powder from light brown with a greenish tint to brown, with a specific odor	Наличие флавоноидов и тритерпеновых сапонинов Presence of flavonoids and triterpene saponins	1,20 ± 0,06

Таблица 5. Технологические свойства сухих экстрактов

Table 5. Technological properties of dry extracts

Показатель Index	Наименование Name				
	СЭ шалфея лекарственного Dry extract of salvia officinalis	СЭ календулы лекарственной Dry extract of calendula officinalis	СЭ тысячелистника обыкновенного Dry extract of yarrow	СЭ кровохлебки лекарственной Dry extract of medicinal burnet	СЭ астрагала шерстистоцветкового Dry extract of astragalus woolly- flowered
Насыпная масса до уплотнения, г/см ³ Bulk weight before compaction, g/cm ³	0,24 ± 0,30	0,21 ± 0,30	0,27 ± 0,20	0,25 ± 0,30	0,26 ± 0,20
Насыпная масса после уплотнения, г/см ³ Bulk weight after compaction, g/cm ³	0,26 ± 0,20	0,25 ± 0,10	0,32 ± 0,10	0,31 ± 0,20	0,33 ± 0,10
Сыпучесть без вибрации, г/с Free flow without vibration, g/s	2,04 ± 0,20	1,95 ± 0,30	1,89 ± 0,20	2,00 ± 0,10	1,93 ± 0,20
Сыпучесть в режиме вибрации, г/с Looseness in vibration mode, g/s	5,20 ± 0,20	5,03 ± 0,30	5,01 ± 0,40	5,12 ± 0,20	5,02 ± 0,30
Угол естественного откоса, ° Angle of repose, °	36–38 удовлетворительная сыпучесть 36–38 satisfactory flowability				
Остаточная влажность, % Residual moisture, %	4,64 ± 0,30	4,89 ± 0,20	5,02 ± 0,30	4,62 ± 0,50	4,97 ± 0,40

Таблица 6. Состав шипучих гранул на одну дозу
(саше массой 5,0 г.)

Table 6. Composition of effervescent granules per dose
(sachet weighing 5.0 g)

Компонент Component	Содержание компонента в одной дозе Component content in one dose	
	%	г g
Гидрокарбонат натрия Sodium bicarbonate	16,8	0,84
Лимонная кислота Lemon acid	20,0	1,00
Микрокристаллическая целлюлоза – 90 (EMCOCEL®90M) Microcrystalline cellulose – 90 (EMCOCEL®90M)	38,0	1,90
10 % спиртоводный раствор Plasdone™ K-29/32 10 % alcohol-water solution Plasdone™ K-29/32	5,2	0,26
Сухой экстракт шалфея лекарственного Dry extract of salvia officinalis	4,0	0,20
Сухой экстракт календулы лекарственной Dry extract of calendula officinalis	4,0	0,20
Сухой экстракт тысячелистника обыкновенного Dry extract of yarrow	4,0	0,20
Сухой экстракт кровохлебки лекарственной Dry extract of medicinal burnet	4,0	0,20
Сухой экстракт астрагала шерстистоцветкового Dry extract of astragalus woolly-flowered	4,0	0,20
Итого: Total:	100,0	5,00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследовательской работы определены числовые показатели ЛРС и подтверждено его качество, что позволило использовать его для дальнейшего получения сухих экстрактов. Выбраны условия экстрагирования для каждого вида сырья, наработаны сухие экстракты и определены показатели качества в соответствии с требованиями ГФ XIV. Подобраны вспомогательные вещества с учетом свойств сухих экстрактов, разработан состав и технология шипучих гранул на основе фитоэкстрактов, предложен проект спецификации на шипучие гранулы в соответствии с требованиями ГФ XIV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петерсен П. Э. Распространенность стоматологических заболеваний. Факторы риска и здоровье полости рта. Основные проблемы общественного здравоохранения. *Dental Forum*. 2017;1(64):2-11.
2. Гончарова Е. И. Растительные средства в профилактике и лечении заболеваний пародонта. *Российский стоматологический журнал*. 2012;3:48–52.
3. Акамова А. В., Немятых О. Д., Наркевич И. А. Многовекторный маркетинговый анализ российского рынка фитопрепаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(4):276–280.
4. Гизингер О. А., Хисамова А. А. Биофармацевтические исследования при разработке лекарственной формы с метионином и экстрактом куркумы длинной (*Curcuma longa L.*). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):42–48. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-42-48.
5. Martinez C. C., Gomez M. D., Oh M. S. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: A Review. *Pharmaceutical Biology*. 2017;55(1):1992–1998. DOI: 10.1080/13880209.2017.1347188.
6. Arada J. M. G., Perez Z. C. Phytotherapy in dentistry: survey of products of plant origin for health oral. *Brazilian journal implantology and health sciences*. 2019;1(3):35–40. DOI: 10.36557/2674-8169.2019v1n3p35.

Таблица 7. Проект спецификации показателей качества шипучих гранул на основе фитоэкстрактов

Table 7. Draft specification of quality indicators for effervescent granules based on phytoextracts

Показатель качества Level of quality	Метод анализа Analysis method	Результат испытаний Test result
Описание Description	Органолептический Organoleptic	Гранулы неправильной формы светло-коричневого цвета Irregular light brown granules
Цвет, форма, размер частиц Color, shape, particle size	Визуальный Visual Ситовой анализ Sieve analysis	Светло-коричневые гранулы размером от 0,4 до 2 мм Light brown granules from 0.4 to 2 mm
Потеря в массе при высушивании, % Weight loss on drying, %	Термогравиметрический Thermogravimetric Не более 5 No more than 5	1,50 ± 0,05
pH водного раствора pH of aqueous solution	Потенциометрический Potentiometric	6,35 ± 0,32
Распадаемость Disintegration	Не более 5 мин No more than 5 minutes	0,5 мин Соответствует 0.5 min Match
Растворение Dissolution		Не проводится, т. к. время распадаемости менее 5 минут Not carried out since disintegration time is less than 5 minutes

7. Gupta P., Shetty H. Use of natural products for oral hygiene maintenance: revisiting traditional medicine. *Journal of complementary and integrative medicine*. 2018;15(3):20150103. DOI: 10.1515/jcim-2015-0103.
8. Thombre N., Thete M., Shimpi P. Review on role of herbs in management of oral diseases. *Asian journal pharmaceutical research*. 2020;10(4):321–326. DOI: 10.5958/2231-5691.2020.00055.6. 8.
9. Jena S., Kumar G., Singh D. K., Sethi A. K. Herbs used in dentistry: Need of the new era. *Journal primary care dentistry and oral health*. 2021;2:11–13. DOI: 10.4103/jpcdoh.jpcdoh_7_20.
10. Орехова Л. Ю., Кудрявцева Т. В., Бурлакова Ю. С. Системы локальной доставки лекарственных препаратов в пародонтологии. *Пародонтология*. 2016;1(78):34–39.
11. Абдурахманова С. А., Рунова, Г. С. Обзор современных фито-препаратов, применяемых в лечении воспалительных заболеваний пародонта. *Российская стоматология*. 2018;(4):37–41. DOI: 10.17116/rostromat20181104137.
12. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/>. Ссылка активна на 03.05.2021.
13. van Riet-Nales D. A., Schobben A. F. A. M., Vromans H., Egberts T. C., Rademaker C. M. Safe and effective pharmacotherapy in infants and preschool children: importance of formulation aspects. *Archives of disease in childhood*. 2016;101(7):662–669. DOI: 10.1136/archdischild-2015-308227.
14. Балакина М. В., Охотникова В. Ф. Гранулы как перспективная лекарственная форма. Материалы первой научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века». 2013, 25–26 февраля; Москва, Россия: ВИЛАР; 2013. С. 12–14.
15. Охотникова В. Ф., Качалина Т. В., Балакина М. В., Качалин Д. С., семкина О. А., Отц Н. Ю., Саканян К. М. Современное состояние и перспективы развития технологии твердых лекарственных форм для внутреннего применения с растительными сухими экстрактами. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012;(1):139–143.
16. Балакина М. В., Охотникова В. Ф., Семкина О. А. Быстро растворимые гранулы – рациональная и современная лекарственная форма. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015;(11):22–26.
17. Степанова О. И., Беляцкая А. В., Краснюк (мл.) И. И., Король Л. А. Разработка состава и технологии быстрорастворимых лекарственных форм фурацилина. *Фармация*. 2015;64(3):36–39.
18. Maysarah H., Sari I., Faradilla M., Kwok K. Formulation of effervescent granule from robusta green coffee bean ethanolic extract (*Coffea canephora*). *Journal of pharmacy & BioAllied sciences*. 2020;12(2):743–746. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_258_19.
19. Devi J. R., Das B. Preparation and evaluation of ibuprofen effervescent granules. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*. 2019;12(8):52–55. DOI: 10.22159/ajpcr.2019.v12i18.33994.
20. Satapathy S. R., Patra M., Patnaik M. Process and variation in effervescent formulation. Review. *Innovat International journal of medical & pharmaceutical sciences*. 2016;1:1–3. DOI: 10.24018/10.24018/ijmps.2018.v1i1.22.
21. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 03.05.2021.
22. Балакина М. В., Охотникова В. Ф. Разработка шипучих лекарственных форм гранул, содержащих экстракти мальвы лесной и солодки. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». 2011;(66):234–235.
23. Новикова Е. К., Чачин Д. А., Каухова И. Е., Минина С. А. Разработка и стандартизация гранул в твёрдых желатиновых капсулах на основе композиции сухих экстрактов череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(4):44–48.
24. Егошина Ю. А., Поцелуева Л. А. Современные вспомогательные вещества в таблеточном производстве. *Успехи современного естествознания*. 2009;10:30–33.
25. van der Merwe J., Steenkamp J., Steyn D., Hamman J. The role of functional excipients in solid oral dosage forms to overcome poor drug dissolution and bioavailability. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):393. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050393.

REFERENCES

1. Petersen P. E. The prevalence of dental diseases. Risk factors and oral health. Major public health problems. *Dental Forum*. 2017;1(64):2–11. (In Russ.)
2. Goncharova E. I. Herbal remedies in the prevention and treatment of periodontal disease. *Rossiyskiy stomatologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Dentistry*. 2012;3:48–52. (In Russ.)

3. Akamova A. V., Nemyatykh O. D., Narkevich I. A. Multiple view marketing analysis of the russian plant-based drugs market. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;(4):276–280. (In Russ.)
4. Gizinger O. A., Khisamova A. A. Biopharmaceutical trials of a dosage form, which contain methionine and turmeric extract (*Curcuma longa* L.). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):42–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-42-48.
5. Martinez C. C., Gomez M. D., Oh M. S. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: A Review. *Pharmaceutical Biology*. 2017;55(1):1992–1998. DOI: 10.1080/13880209.2017.1347188.
6. Arada J. M. G., Perez Z. C. Phytotherapy in dentistry: survey of products of plant origin for health oral. *Brazilian journal implantology and health sciences*. 2019;1(3):35–40. DOI: 10.36557/2674-8169.2019v1n3p35.
7. Gupta P., Shetty H. Use of natural products for oral hygiene maintenance: revisiting traditional medicine. *Journal of complementary and integrative medicine*. 2018;15(3):20150103. DOI: 10.1515/jcim-2015-0103.
8. Thombre N., Thete M., Shimpi P. Review on role of herbs in management of oral diseases. *Asian journal pharmaceutical research*. 2020;10(4):321–326. DOI: 10.5958/2231-5691.2020.00055.6. 8.
9. Jena S., Kumar G., Singh D. K., Sethi A. K. Herbs used in dentistry: Need of the new era. *Journal primary care dentistry and oral health*. 2021;2:11–13. DOI: 10.4103/jpcdoh.jpcdoh_7_20.
10. Orekhova L. Yu., Kudryavtseva T. V., Burlakova Yu. S. Drugs local delivery system in periodontology. *Parodontologiya = Periodontics*. 2016;1(78):34–39. (In Russ.)
11. Abdurakhmanova, S. A., Runova, G. S. Review of modern herbal preparations used in treatment of inflammatory periodontal diseases. *Rossiyskaya stomatologiya = Russian journal of stomatology*. 2018;(4):37–41. (In Russ.) DOI: 10.17116/rossomat20181104137.
12. *Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv* [State register of medicines]. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/> Accessed: 05.03.2021. (In Russ.)
13. van Riet-Nales D. A., Schobben A. F. A. M., Vromans H., Egberts T. C., Rademaker C. M. Safe and effective pharmacotherapy in infants and preschool children: importance of formulation aspects. *Archives of disease in childhood*. 2016;101(7):662–669. DOI: 10.1136/archdischild-2015-308227.
14. Balakina M. V., Okhotnikov C. F. *Granuly kak perspektivnaya lekarstvennaya forma. Materialy pervoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molodye uchenye i farmatsiya XXI veka»* [Granules as a promising dosage form. Materials of the first scientific and practical the first conference "Young Scientists and Pharmacy of the XXI Century"]. 2013, Feb 25–26; Moscow, Russia: VILAR; 2013. P. 12–14. (In Russ.)
15. Okhotnikova V. F., Kachalina T. V., Balakina M. V., Kachalin D. S., Semkina O. A., Otch N. Y. Current state and prospects of technology development of solid dosage forms for internal use with plant dry extracts. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2012;(1):139–143. (In Russ.)
16. Balakina M. V., Okhotnikova V. F., Semkina O. A. Fast dissolving granules – rational and modern dosage form. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2015;(11):22–26. (In Russ.)
17. Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnyuk (Jr.) I. I., King L. A. Development of the composition and technology of rapidly dissolving dosage forms of furacilin. *Farmaciya = Pharmacy*. 2015;64(3):36–39. (In Russ.)
18. Maysarah H., Sari I., Faradilla M., Kwok K. Formulation of effervescent granule from robusta green coffee bean ethanolic extract (*Coffea canephora*). *Journal of pharmacy & BioAllied sciences*. 2020;12(2):743–746. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_258_19.
19. Devi J. R., Das B. Preparation and evaluation of ibuprofen effervescent granules. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*. 2019;12(8):52–55. DOI: 10.22159/ajpcr.2019.v12i18.33994.
20. Satapathy S. R., Patra M., Patnaik M. Process and variation in effervescent formulation. Review. *Innovat International journal of medical & pharmaceutical sciences*. 2016;1:1–3. DOI: 10.24018/10.24018/ijmps.2018.v1i1.22.
21. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 03.05.2021. (In Russ.)
22. Balakina M. V., Okhotnikova V. F. Development of effervescent dosage forms of granules containing extracts of wild mallow and licorice. *Sbornik nauchnykh trudov «Razrabotka, issledovaniye i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii»*. 2011;(66):234–235. (In Russ.)
23. Novikova E. K., Chachin D. A., Kaukhova I. E., Minina S. A. Development and standardization of granules in hard gelatin capsules based on the composition of dry extracts of a series of tripartite herbs, canadian herb goldenrod, common grass agaric. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(4):44–48. (In Russ.)
24. Egoshina Yu. A., Potselueva L. A. Modern excipients in tablet production. *Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya = Advances in current natural sciences*. 2009;10:30–33. (In Russ.)
25. van der Merwe J., Steenekamp J., Steyn D., Hamman J. The role of functional excipients in solid oral dosage forms to overcome poor drug dissolution and bioavailability. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):393. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050393.

Изучение технологических свойств вспомогательных веществ при разработке состава орально диспергируемых таблеток

И. Д. Касымов*, А. В. Басевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Касымов Илья Данилович. E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

ORCID: И. Д. Касымов – <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>; А. В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>.

Статья поступила: 20.10.2021 Статья принята в печать: 29.11.2021 Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. В статье представлены результаты изучения технологических свойств отдельных вспомогательных веществ, широко используемых в составах существующих орально диспергируемых таблеток (ОДТ), для последующего планирования многофакторного эксперимента. Образцы вспомогательных веществ были проанализированы по таким фармакопейным показателям, как описание, сыпучесть, насыпная плотность, прессуемость, фракционный состав, растворимость в воде.

Цель. Цель работы – создание перечня и изучение технологических свойств веществ-кандидатов на роль вспомогательных веществ в разрабатываемом ОДТ составе.

Материалы и методы. Изучение технологических свойств образцов вспомогательных веществ проводили по методикам Государственной Фармакопеи XIV издания с помощью тестера сыпучести GTL (ERWEKA, Германия), тестера насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA, Германия), таблетпресса PGR-10 (LabTools, Россия), тестера твердости таблеток TBH 125 TDP (ERWEKA, Германия).

Результаты и обсуждение. В результате исследования были собраны экспериментальные данные о технологических свойствах образцов вспомогательных веществ, проведено сравнение выбранных образцов по фармацевтико-технологическим показателям.

Заключение. В ходе выполнения исследования был сформирован перечень вспомогательных веществ для разработки состава ОДТ, проведены исследования их технологических свойств. Полученные экспериментальные данные позволяют разработать оптимальную матрицу многофакторного эксперимента по разработке состава ОДТ и обосновать выбор вспомогательных веществ.

Ключевые слова: орально диспергируемые таблетки, вспомогательные вещества, технологические свойства, сыпучесть, насыпная плотность, прессуемость

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

Вклад авторов. И. Д. Касымов, А. В. Басевич – авторы идеи. И. Д. Касымов – проведение экспериментов по изучению технологических свойств вспомогательных веществ и обработка полученных данных. И. Д. Касымов, А. В. Басевич – написание текста статьи и обсуждение результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании BASF за безвозмездно предоставленные образцы вспомогательных веществ.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России».

Для цитирования: Касымов И. Д., Басевич А. В. Изучение технологических свойств вспомогательных веществ при разработке состава орально диспергируемых таблеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4-1):46–53. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-46-53](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53)

Study of the Technological Properties of Excipients in the Development of the Composition of Orally Dispersible Tablets

Ilya D. Kasymov*, Anna V. Basevich

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Ilya. D. Kasymov. E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

ORCID: Ilya. D. Kasymov – <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>; Anna V. Basevich – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>.

Received: 20.10.2021 Revised: 29.11.2021 Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. The article presents the results of studying the technological properties of individual excipients widely used in the compositions of existing orally dispersed tablets (ODT) for subsequent planning a multifactorial experiment. Samples of excipients were analyzed according to such pharmacopoeial indicators as description, flowability, bulk density, compressibility, fractional composition, solubility in water.

Aim. The aim of the work is to create a list and study the technological properties of candidate substances for the role of auxiliary substances in the composition being developed by the ODT.

Materials and methods. The technological properties of excipient samples were studied according to the methods of the State Pharmacopoeia of the XIV edition using the flowability tester GTL (ERWEKA, Germany), the bulk density tester SVM 221 (ERWEKA, Germany), the tablet press PGR-10 (LabTools, Russia) and the tablet hardness tester TBH 125 TDP (ERWEKA, Germany).

Results and discussion. As a result of the study, experimental data on the technological properties of excipient samples were collected, and the selected samples were compared according to pharmaceutical and technological indicators.

Conclusion. In the course of the study, a list of auxiliary substances for the development of the composition of ODT was formed and studies of their technological properties were carried out. The obtained experimental data will allow to develop an optimal matrix of a multifactorial experiment for the development of the composition of ODT and justify the choice of excipients.

Keywords: orally dispersible tablets, excipients, technological properties, flowability, bulk density, compressibility

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. Ilya D. Kasymov, Anna V. Basevich – the authors of the idea. Ilya D. Kasymov – conducting experiments to study the technological properties of excipients and processing the data obtained. Ilya D. Kasymov, Anna V. Basevich – writing the text of the article and discussing the results.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to BASF for the samples of auxiliary substances provided free of charge.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Kasymov I. D., Basevich A. V. Study of the technological properties of excipients in the development of the composition of orally dispersible tablets. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):46–53. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-46-53](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53)

ВВЕДЕНИЕ

Орально диспергируемые таблетки (ОДТ) – это перспективная лекарственная форма, распадающаяся в ротовой полости без приёма воды не более чем за 3 минуты. Для большинства таблеток характерными недостатками являются: большое количество вспомогательных компонентов, которые, по сути, являются балластными для организма; трудности приёма из-за возможной дисфагии. Орально диспергируемые таблетки лишены этих недостатков, а также предлагают более высокую приверженность лечению и более быстрое наступление терапевтического эффекта за счёт начала всасывания лекарственного вещества в ротовой полости [1–5].

Известно, что препараты, содержащие одно и то же действующее вещество, но разный состав вспомогательных компонентов, могут различаться по биодоступности, эффективности, скорости наступления терапевтического эффекта и другим характеристикам [2, 4]. По этой причине грамотным подходом при разработке состава лекарственного средства (ЛС), в частности ОДТ, является проведение многофакторного эксперимента с целью установления влияния различных вспомогательных веществ и их количеств на свойства конечного разрабатываемого ЛС и выбора самого оптимального состава. В то же время на рынке вспомогательных веществ сегодня доступен очень широкий выбор компонентов, и включение большого числа вспомогательных веществ увеличивает и без того немалые сроки разработки состава. Учитывая также, что в ОДТ важное место занимают

органолептические свойства и скорость распадаемости, перед началом разработки состава рекомендуется проводить изучение технологических свойств индивидуальных вспомогательных веществ с целью исключения из опытов неудовлетворительных кандидатов на эту роль в составе.

Ещё одним доводом в пользу исследования отдельных вспомогательных веществ является то, что полученные данные позволяют выявить критические моменты в требованиях к их качеству и условиям хранения, что позволит избежать проблем при производстве и разработать и обосновать спецификации качества на используемые вспомогательные вещества [6].

Таким образом, целью настоящего исследования стало создание перечня потенциальных вспомогательных веществ (для последующей разработки состава лекарственного средства в форме ОДТ) и изучение их технологических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На основе литературных данных для анализа технологических свойств были выбраны следующие вспомогательные вещества: маннитол (Roquette, Франция), сорбитол (Roquette, Франция), мальтодекстрин (Roquette, Франция), микрокристаллическая целлюлоза (JRS Pharma, Германия), лактоза (DFE Pharma, Германия), кроскарамелоза натрия (Roquette, Франция), кросповидон (Kollidon CL-SF, BASF, Германия), кросповидон (Polyplasdone XL-10, Ashland, США), крахмал кукурузный (Roquette, Франция), тальк (Nitika,

Индия), кальция стеарат (Tablube C, Nitika, Индия), натрия стеарилфумарат (JRS Pharma, Германия), готовая смесь эксципиентов для прессования ОДТ Ludiflash® (BASF, Германия).

Определение технологических свойств вспомогательных веществ проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи 14 издания по следующим показателям:

- Описание – визуально оценивался внешний вид и отличительные свойства образца.
- Ситовой анализ (определение фракционного состава) проводили с помощью набора ручных сит с размерами ячеек 0,5, 0,25 и 0,1 мм по методике, описанной в ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ».
- Степень сыпучести порошков определяли с помощью тестера сыпучести GTL (ERWEKA, Германия) по методике, описанной в ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков», а именно по времени прохождения навески через воронку (с насадкой № 1). В отдельных случаях был использован метод определения сыпучести по углу естественного откоса.
- Насыпные характеристики, такие как насыпная плотность до и после уплотнения, определяли с использованием тестера насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA, Германия) по методике, изложенной в ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков». По полученным результатам были рассчитаны коэффициенты Хауснера и Карра.
- Растворимость в воде проверялась по методике, описанной в ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость».
- Прессуемость вспомогательных веществ проверяли с использованием таблетпресса ПГР-10 (LabTools, Россия) путем прессования из них модельных таблеток с одинаковой массой при одинаковом давлении прессования. Полученные таблетки оценивались визуально и на прочность на раздавливание с применением тестера твердости таблеток ТВН 125 TDP (ERWEKA, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании анализа литературных данных [1–5, 7–11] и изучения составов лекарственных средств в виде орально диспергируемых таблеток, зарегистрированных на рынке, был составлен перечень вспомогательных веществ-кандидатов, предлагаемых к применению в разработке состава ОДТ. Все вспомогательные вещества-кандидаты были разделены на группы по назначению (таблица 1).

В качестве связующих компонентов, повышающих прочность таблетки, было решено использовать вещества из группы наполнителей.

Кроме отдельных вспомогательных веществ в перечень веществ-кандидатов была включена готовая смесь эксципиентов для прессования орально диспергируемых таблеток, с целью сравнения ее технологических свойств с остальными веществами и оценки целесообразности использования подобных решений.

Результаты определения технологических свойств.

Сыпучесть. Характеристика сыпучести определялась по времени прохождения навески образца через воронку. Результаты исследования сыпучести образцов вспомогательных веществ представлены в таблице 2 в секундах с точностью до 0,1 сек., отнесенных к 100 г образца. Из представленных результатов видно, что использование любого из выбранных дезинтегрантов может ухудшить сыпучесть конечной смеси для таблетирования, а для использования таких наполнителей, как МКЦ, лактоза и кукурузный крахмал, необходимо принять меры по улучшению сыпучести смеси.

Фракционный состав. Результаты исследования фракционного состава образцов представлены на рисунке 1. Из диаграммы видно, что образец сорбитола имеет самые крупные частицы. В образцах маннитола, мальтодекстрина и готовой смеси эксципиентов преобладает фракция частиц размером от 0,25 мм до 0,1 мм. Остальные образцы вспомогательных веществ – это мелкодисперсные порошки, что негативно сказывается на их сыпучести и создает сильное пыление при работе.

Насыпные характеристики. Результаты определения насыпной плотности образцов в свободном и уплотненном состоянии представлены в таблице 3.

Индексы Хауснера и Карра позволяют оценить сжимаемость и текучесть порошка. Чем меньше их значения, тем лучше данные свойства. Значение индекса Хауснера не должно превышать 1,36, а индекс Карра считается приемлемым до значения 26 %.

Согласно результатам испытания, образец сорбитола обладает наилучшими сжимаемостью и текучестью. Образцы маннитола, мальтодекстрина и готовой смеси соответствуют критериям приемлемости данных коэффициентов. Использование лактозы и МКЦ в качестве наполнителей потребует решения проблем с текучестью смеси. Введение дезинтегрантов в значительных количествах может снизить текучесть смеси.

Растворимость в воде. Результаты определения растворимости образцов в воде представлены в таблице 4.

Согласно результатам анализа растворимости, лучше всего на роль наполнителя для ОДТ подходят маннитол и сорбитол ввиду их легкой и быстрой растворимости. Мальтодекстрин и лактоза обладают меньшей растворимостью. Остальные наполнители обладают низкой растворимостью, их применение может быть оправдано более низкой ценой и потребует повышенного внимания к скорости распада таблеток.

Все дезинтегранты практически или полностью не растворяются в воде, поэтому при растворении ОДТ в ротовой полости необходимо регулировать у данных веществ размер частиц, поскольку наличие крупных частиц может отрицательно сказаться на органолептических свойствах лекарственного средства.

Таблица 1. Перечень вспомогательных веществ-кандидатов с указанием их назначений

Table 1. List of candidate excipients with indication of their purpose

Назначение Purpose	Вещество Excipient	Описание Description
Наполнители Fillers	Маннитол Mannitol	Белый кристаллический порошок. Имеет приятный сладкий вкус White crystalline powder. It has a pleasant sweet taste
	Сорбитол Sorbitol	Порошок белого цвета. Имеет плотные различимые частицы. Сладкий на вкус, создает ощущение «холода» во рту White powder. It has dense distinguishable particles. Sweet taste, creates a feeling of «cold» in the mouth
	Мальтодекстрин Maltodextrin	Белый кристаллический порошок. Частицы различимы глазом. Имеет приятный вкус «сухих сливок». Сильно пачкает поверхности, делая их липкими White crystalline powder. The particles are distinguishable by the eye. It has a pleasant taste of «dry cream». It heavily stains the surfaces, making them sticky
	Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystalline cellulose	Белый мелкокристаллический порошок, частицы почти не различимы глазом. При работе создает сильное пыление. Имеет нейтральный вкус White fine-crystalline powder, the particles are almost invisible to the eye. When working, it creates a strong dusting. It has a neutral taste
	Лактоза Lactose	Белый мелкодисперсный порошок, частицы почти не различимы глазом. Имеет сладковатый вкус White fine powder, the particles are almost invisible to the eye. It has a sweet taste
Дезинтегранты Disintegrants	Крахмал кукурузный Corn starch	Желтовато-белый мелкодисперсный порошок. Не имеет выраженного вкуса, имеет отчётливый запах кукурузы Yellowish-white fine powder. It has no pronounced taste, has a distinct smell of corn
	Кроскаремеллоза натрия Crocscarmellose sodium	Белый порошок, частицы едва различимы. Не имеет выраженного вкуса White powder, the particles are barely distinguishable. It has no pronounced taste
	Кросповидон Crospovidon (Kollidon CL-SF)	Белый мелкодисперсный порошок. Частицы абсолютно не различимы глазом. Безвкусный. Создает чрезвычайно сильное пыление при работе White fine powder. The particles are absolutely indistinguishable by the eye. Tasteless. Creates an extremely strong dusting during operation
Опудриватели* Powdering agents	Кальция стеарат Calcium Stearate	Белый мелкодисперсный порошок. Безвкусный, создает сильное пыление White fine powder. Tasteless, creates a strong dusting
	Стеарил фумарат натрия Sodium Stearyl Fumarate	Самый белый из опудривателей. Мелкодисперсный, пылящий, безвкусный The whitest of the powdering agents. Fine, dusty, tasteless
	Тальк Talcum	Серо-белый порошок. Мелкодисперсный, пылящий, безвкусный Gray-white powder. Fine, dusty, tasteless
Готовая смесь для прессования Ready-made mixture for pressing	Лудифлеш® Ludiflash®	Жёлто-белый сыпучий порошок с частицами разного размера. Сладковатый на вкус, создает приятное ощущение таяния во рту Yellow-white loose powder with particles of different sizes. It has a sweet taste, creates a pleasant feeling of melting in the mouth

Примечание. * Ввиду использования в составах таблеток чрезвычайно малых количеств вспомогательных веществ группы опудривателей, некоторые тесты было решено с ними не проводить.

Note. * Due to the use of extremely small amounts of powdering agents in tablet formulations, it was decided not to conduct some individual tests with them.

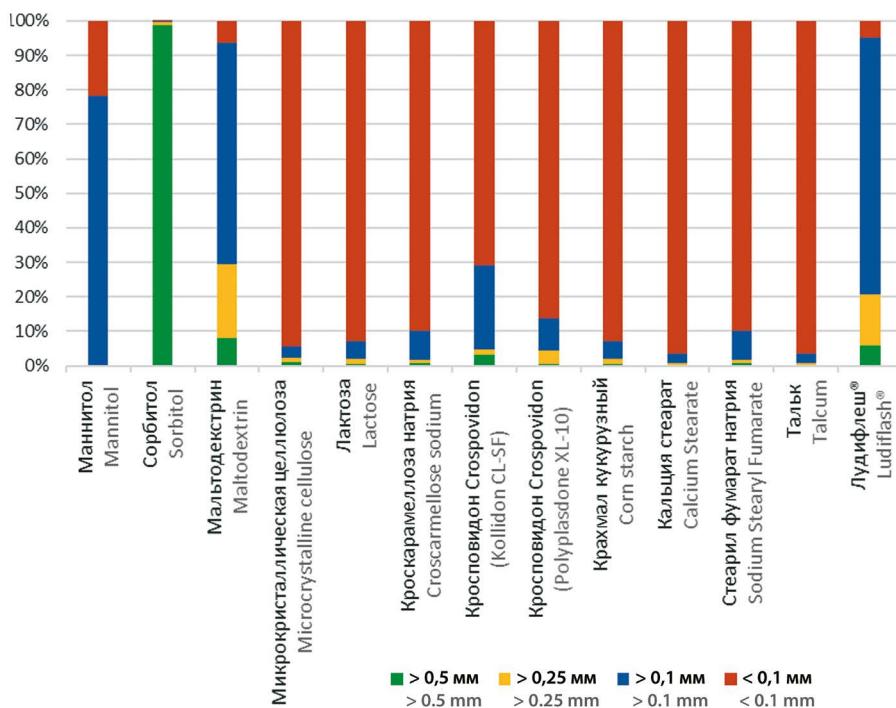


Рисунок 1. Фракционный состав вспомогательных веществ

Figure 1. Fractional composition of excipients

Таблица 2. Характеристика сыпучести вспомогательных веществ

Table 2. Characteristics of the flowability of excipients

Вещество Excipient	Время прохождения образца через воронку, отнесенное к 100 г-ва, сек. The time of passage of the sample through the funnel, attributed to 100 g per second.	Степень сыпучести Degree of flowability
Маннитол Mannitol	13,9 ± 1,0	Хорошая Good
Сорбитол Sorbitol	10,9 ± 0,1	Хорошая Good
Мальтодекстрин Maltodextrin	10,6 ± 0,3	Хорошая Good
Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystalline cellulose	–	Очень плохая, требовалась дополнительная вибрация Very bad, additional vibration was required
Лактоза Lactose	102,3 ± 4,3	Неудовлетворительная Unsatisfactory
Кроскарамеллоза натрия Crocscarmellose sodium	34,1 ± 0,8	Неудовлетворительная Unsatisfactory
Кросповидон Crospovidon (Kollidon CL-SF)	–	Очень плохая, образец не проходил через воронку вовсе Very bad, the sample did not pass through the funnel at all
Кросповидон Crospovidon (Polyplasdone XL-10)	–	Очень плохая, без дополнительной вибрации образец за- стревал в воронке Very bad, without additional vibration, the sample got stuck in the funnel
Крахмал кукурузный Corn starch	70,5 ± 2,9	Сыпучесть неудовлетворительная. С каждым разом резуль- тат испытания был все хуже. Это может быть связано с высокой гигроскопичностью вещества The flowability is unsatisfactory. Each time the test result was worse. This may be due to the high hygroscopicity of the substance
Лудифлеш® Ludiflash®	11,4 ± 0,9	Хорошая Good

Таблица 3. Насыпные характеристики вспомогательных веществ

Table 3. Bulk characteristics of excipients

Вещество Excipient	Насыпные характеристики Bulk characteristics			
	Насыпная плотность до уплотнения ρ_0 , г/мл Bulk density before compaction ρ_0 , g/ml	Насыпная плотность после уплотнения ρ_k , г/мл Bulk density after compaction ρ_k , g/ml	Индекс Хауснера Hausner Index	Индекс Карра, % Carr Index, %
Маннитол Mannitol	0,462 ± 0,007	0,549 ± 0,007	1,19	18,83
Сорбитол Sorbitol	0,611 ± 0,018	0,676 ± 0,003	1,11	10,64
Мальтодекстрин Maltodextrin	0,552 ± 0,005	0,668 ± 0,002	1,21	21,01
Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystalline cellulose	0,327 ± 0,002	0,494 ± 0,002	1,51	51,07
Лактоза Lactose	0,515 ± 0,001	0,783 ± 0,008	1,52	52,04
Кроскаремеллоза натрия Croscarmellose sodium	0,402 ± 0,007	0,563 ± 0,003	1,40	40,05
Кросповидон Crospovidon (Kollidon CL-SF)	0,181 ± 0,002	0,268 ± 0,003	1,48	48,07
Кросповидон Crospovidon (Polyplasdone XL-10)	0,303 ± 0,005	0,462 ± 0,007	1,52	50,52
Крахмал кукурузный Corn starch	0,479 ± 0,002	0,721 ± 0,003	1,50	50,52
Лудифлеш® Ludiflash®	0,510 ± 0,002	0,645 ± 0,001	1,26	26,47

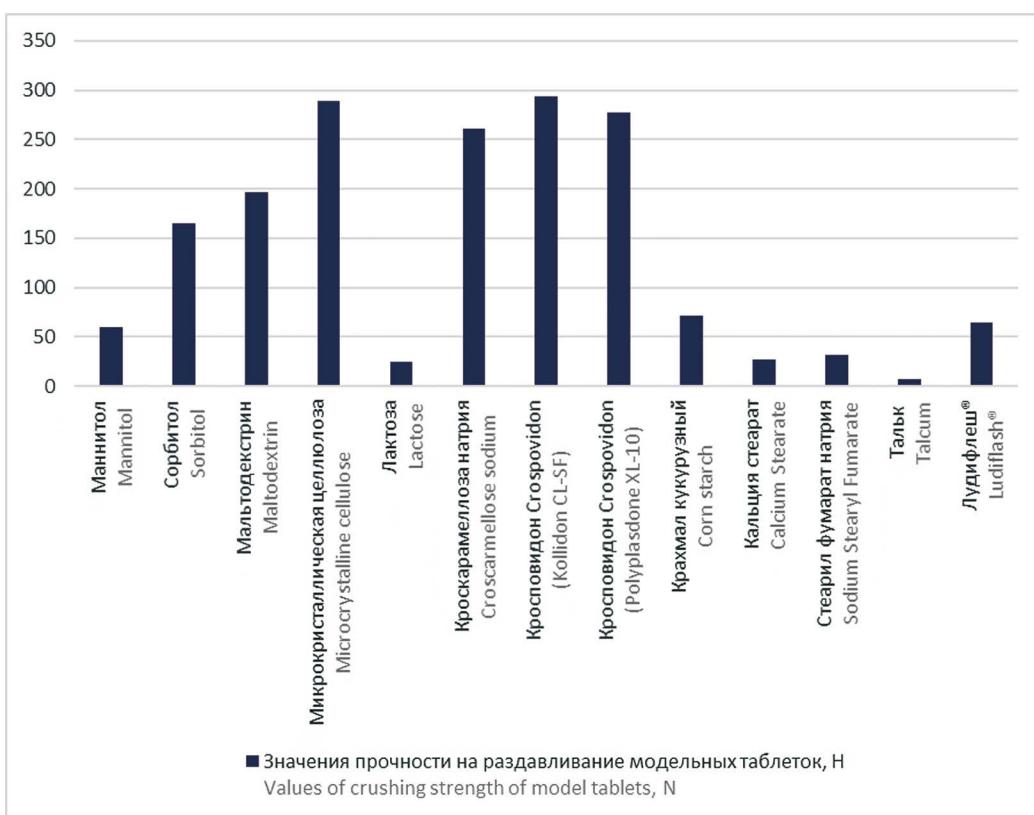


Рисунок 2. Прочность модельных таблеток на раздавливание

Figure 2. Crushing strength of model tablets

Таблица 4. Растворимость вспомогательных веществ в воде

Table 4. Solubility of excipients in water

Вещество Excipient	Растворимость образца Solubility of excipients	Особенности Features
Маннитол Mannitol	Очень легко растворим Very easily soluble	Быстро растворяется даже в холодной воде It dissolves quickly even in cold water
Сорбитол Sorbitol	Очень легко растворим Very easily soluble	Быстро растворяется даже в холодной воде It dissolves quickly even in cold water
Мальтодекстрин Maltodextrin	Легко растворим Easily soluble	В холодной воде растворяется плохо, набухает и образует слипшийся ком It dissolves poorly in cold water, swells and forms a clump
Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystalline cellulose	Практически не растворим Practically insoluble	Плохо смачивается водой It is poorly wetted with water
Лактоза Lactose	Растворим Soluble	Очень легко супензируется в малом объёме воды It is very easily suspended in a small volume of water
Кроскаремеллоза натрия Croscarmellose sodium	Очень мало растворим Very little soluble	Образует слегка вязкий мутный раствор-супензия Formed a slightly viscous cloudy solution-suspension
Кросповидон Crosppovidon (Kollidon CL-SF)	Практически не растворим Practically insoluble	Образует мелкодисперсную супензию Forms a fine suspension
Кросповидон Crosppovidon (Polyplasdone XL-10)	Практически не растворим Practically insoluble	Образует мелкодисперсную супензию Forms a fine suspension
Крахмал кукурузный Corn starch	Практически не растворим Practically insoluble	Образует мутную супензию Forms a cloudy suspension
Кальция стеарат Calcium Stearate	Практически не растворим Practically insoluble	Очень плохо смачивается водой Very poorly wetted with water
Стеарил фумарат натрия Sodium Stearyl Fumarate	Мало растворим Slightly soluble	Смачивается немного лучше остальных опудривателей It is wetted a little better than other dusters
Тальк Talcum	Практически не растворим Practically insoluble	Очень плохо смачивается водой Very poorly wetted with water
Лудифлеш® Ludiflash®	Легко растворим, за исключением одного компонента смеси Easily soluble, except for one component of the mixture	В составе смеси есть нерастворимый, легко идентифицируемый в воде компонент, в остальном смесь полностью растворяется The mixture contains an insoluble, easily identifiable component in water, otherwise the mixture is completely dissolved

Опудривающие вещества также не растворимы в воде, но интересным оказался тот факт, что стерил фумарат натрия (в отличие от талька и стеарата кальция) лучше смачивается водой, что может способствовать ускорению распада ОДТ.

Прессуемость. Оценку прессуемости образцов вспомогательных веществ проводили по прочности модельных таблеток на раздавливание в Ньютонах. Масса модельных таблеток составляла 300 мг, диаметр матрицы – 12 мм, давление прессования – 20 бар. Результаты определения прочности на раздавливание представлены на рисунке 2. По данным диаграммы видно, что микрокристаллическая целлюлоза делает таблетки очень прочными, что может

быть излишне в ОДТ. Таблетки маннитола, сорбита и мальтодекстрина обладают приемлемыми показателями прочности и имеют хороший товарный вид, таблетки мальтодекстрина имели гладкую блестящую поверхность. Таблетки лактозы оказались весьма хрупкими. Вещества группы дезинтегрантов, судя по прочности полученных таблеток, должны повышать прочность модельных составов. Особенностью таблеток из веществ группы опудривателей является самое легкое усилие выдавливания таблеток из матрицы. Наилучшие характеристики прессуемости как по показателям прочности, так и по внешнему виду, ожидались у таблеток готовой смеси для прессования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Были подобраны вспомогательные вещества, которые будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке состава орально диспергируемых таблеток.
2. Был проведен анализ технологических свойств выбранных компонентов.
3. Собранные экспериментальные данные о технологических свойствах будут использованы при выборе технологии и разработке матрицы многофакторного эксперимента, при разработке и обосновании спецификаций качества разрабатываемых орально диспергируемых таблеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Şenel S., Comoglu T. Orally disintegrating tablets, fast-dissolving, buccal and sublingual formulations. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23(5):431. DOI: 10.1080/10837450.2018.1462471.
2. van der Merwe J., Steenekamp J., Steyn D., Hamman J. The Role of functional excipients in solid oral dosage forms to overcome poor drug dissolution and bioavailability. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):393. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050393.
3. Lin Z., Xuan J. Cost-effectiveness of aripiprazole orally disintegrating tablets in the treatment of schizophrenia in China. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*. 2020;20(5):549–557. DOI: 10.1080/14737167.2020.1807331.
4. Mahrous G. M., Ibrahim M. A., Mostafa H. F., Elzayat E. M. Application of a quality-by-design approach for utilizing sodium stearyl fumarate as a taste-masking agent in dextromethorphan hydrobromide orally disintegrating tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24(6):711–719. DOI: 10.1080/10837450.2019.1579228.
5. Comoglu T., Dilek Ozyilmaz E. Orally disintegrating tablets and orally disintegrating mini tablets – novel dosage forms for pediatric use. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24(7):902–914. DOI: 10.1080/10837450.2019.1615090.
6. ICH Q8 Pharmaceutical development. Available at: <http://www.ich.org>. Accessed: 17.05.2021
7. Gulsun T., Akdag Y., Izat N., Cetin M., Oner L., Sahin S. Development and characterization of metformin hydrochloride- and glyburide-containing orally disintegrating tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2020;25(8):999–1009. DOI: 10.1080/10837450.2020.1772290.
8. Yu J., Shan X., Chen S., Sun X., Song P., Zhao R., Hu L. Preparation and evaluation of novel multi-channel orally disintegrating tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;142:105108. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105108.
9. Vanbillemont B., Everaert H., De Beer T. New advances in the characterization of lyophilised orally disintegrating tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;579:119153. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119153.
10. Sharma S., Singh K. Oral Disintegrating tablets – an updated patent perspective. *Recent patents on drug delivery & formulation*. 2020;14(3):166–190. DOI: 10.2174/1872211314999201123202930.
11. Bowles B. J., Dziemidowicz K., Lopez F. L., Orlu M., Tuleu C., Edwards A. J., Ernest T. B. Co-processed excipients for dispersible tablets-part 1: manufacturability. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(6):2598–2609. DOI: 10.1208/s12249-018-1090-4.

Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с применением метода SeDeM

Ю. М. Коцур*, Ю. М. Ладутько, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliyakocur@spcpu.ru

ORCID: Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Ю. М. Ладутько – <https://orcid.org/0000-0001-5741-4050>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 29.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Технология прямого прессования является одной из наиболее распространенных технологий получения таблеток. Как известно, многие активные фармацевтические субстанции не пригодны для данной технологии без добавления специальных вспомогательных веществ. Полезным инструментом для определения пригодности порошкообразных материалов для технологии прямого прессования является метод Sediment Delivery Model (SeDeM), основанный на концепции Quality by Design. Представленный метод позволяет не только оценить пригодность материала для прямого прессования, но также помогает спрогнозировать состав твердой лекарственной формы в виде таблетки, что, в свою очередь, приводит к значительному уменьшению экспериментальных работ, проводимых при разработке нового лекарственного препарата.

Цель. Прогнозирование составов матричных таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением, получаемых путем прямого прессования с использованием метода математического моделирования SeDeM.

Материалы и методы. Объектами исследования являлась оригинальная субстанция 4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия, а также ряд вспомогательных веществ, к числу которых относились полимеры, применяемые для лекарственных форм с пролонгированным высвобождением, определяющий компонент – стеарат магния, а также наполнитель – лактозы моногидрат. Физико-химические и технологические свойства АФС, ВВ, полученных таблеточных смесей и таблеток были изучены в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд. и ЕР 9th ed.

Результаты и обсуждение. Проведена оценка свойств субстанции и вспомогательных веществ в соответствии с методом SeDeM. Установлено, что субстанция 4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия не пригоден для прямого прессования в связи с плохой сыпучестью и низкой прессуемостью. Гипромеллоза Methocel K4M обладала хорошей прессуемостью, однако не обладала достаточной сыпучестью. Другие исследуемые полимеры обладали удовлетворительными свойствами для осуществления технологии прямого прессования. Произведен расчет составов таблеточных смесей при помощи метода SeDeM, полученные таблеточные смеси обладали удовлетворительными технологическими характеристиками для получения таблеток путем прямого прессования. Полученные в результате эксперимента таблетки также соответствовали фармакопейным требованиям.

Заключение. Проведено прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе оригинальной субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с применением метода SeDeM. Установлено, что данный метод является пригодным для разработки состава таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

Ключевые слова: прямое прессование, метод SeDeM, сыпучесть, прессуемость, таблетки с пролонгированным высвобождением, 4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия

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

Вклад авторов. Е. В. Флисюк, Ю. М. Ладутько, И. А. Наркевич, Ю. М. Коцур спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур проводила запланированные исследования. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Коцур Ю. М., Ладутько Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с применением метода SeDeM. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4-1):54–62. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-54-62](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62)

Prediction of the Composition of Prolonged Release Tablets Based on 4,4'-(propandiamido)sodium Dibenzolate Using the SeDeM Method

Julia M. Kotsur*, Julia M. Ladytko, Igor A. Narkevich, Elena V. Flisyuk

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Julia M. Kotsur. E-mail: uliyakocur@spcpu.ru

ORCID: Julia M. Kotsur – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Julia M. Ladytko – <https://orcid.org/0000-0001-5741-4050>; Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 20.10.2021 Revised: 29.11.2021 Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Direct compression technology is one of the most common tablet technologies. As known, many active pharmaceutical ingredients are not suitable for this technology without the addition of special excipients. A useful tool for determining the suitability of powdered materials for direct compression technology is the Sediment Delivery Model (SeDeM) method, based on the concept of Quality by Design. The presented method allows not only to assess the suitability of a material for direct compression, but also helps to predict the composition of a solid dosage form in the form of a tablet, which, in turn, leads to a significant reduction in experimental work carried out in the development of a new drug.

Aim. Prediction of the compositions of matrix tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzate with prolonged release, obtained by direct compression using the method of mathematical modeling SeDeM.

Materials and methods. The objects of the study were the original substance sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzate, as well as a number of auxiliary substances, which included polymers used for dosage forms with prolonged release, a dusting component – magnesium stearate, and a filler – lactose monohydrate. Physicochemical and technological properties of APIs, explosives, obtained tablet mixtures and tablets were studied in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. and EP 9th ed.

Results and discussion. The properties of the substance and excipients were assessed in accordance with the SeDeM method. It was found that the substance 4,4'-(propanediamido) sodium dibenzate is not suitable for direct pressing due to poor flowability and low compressibility. Hypromellose Methocel K4M had good compressibility, but it did not have sufficient flowability. The other tested polymers had satisfactory properties for the direct compression technology. The composition of the tablet mixtures was calculated using the SeDeM method, the obtained tablet mixtures had satisfactory technological characteristics for obtaining tablets by direct compression. The tablets obtained as a result of the experiment also met the pharmacopoeial requirements.

Conclusion. Prediction of the composition of sustained-release tablets based on the original substance sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzate was carried out using the SeDeM method. It was found that this method is suitable for the development of the composition of tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzate.

Keywords: direct compression, SeDeM method, flowability, compressibility, extended release tablets, 4,4'-(propanediamido)dibenzate

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 V. Flisyuk, Julia M. Ladytko, Igor A. Narkevich, Julia M. Kotsur planned an experiment. Julia M. Kotsur conducted the planned studies. All authors participated in data processing, discussion of the results and writing of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Kotsur Ju. M., Ladytko Ju. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Prediction of the composition of prolonged release tablets based on 4,4'-(propanediamido) sodium dibenzate using the SeDeM method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):54–62. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-54-62](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62)

ВВЕДЕНИЕ

Технология прямого прессования является наиболее предпочтительным методом получения таблеток, что обусловлено рядом преимуществ: экономичность, эргономичность и воспроизводимость технологического процесса, простота аппаратурного оформления, отсутствие воздействия влаги и высокой температуры на компоненты таблетки. Известно, что большинство активных фармацевтических субстанций (АФС) не могут быть использованы в технологии прямого прессования без добавления вспомогательных веществ (ВВ), это связано с неудовлетворительными свойствами АФС: низкая сыпучесть и прессуемость, неправильная форма кристаллов и т. д. Используемые в технологии прямого прессования ВВ, правильно подобранные и введенные в состав таблетки в необходимом количестве, могут нивелировать неудовлетворительные свойства АФС.

Метод SeDeM, известный как Sediment Delivery Model, является новой системой, применимой для

определения пригодности сыпучих материалов для прямого прессования, а также для планирования состава таблеток. Это инновационный инструмент, основанный на концепции Quality by Design, описанной в ICH Q8 [1–10].

В основу метода положено изучение физико-химических и технологических свойств сыпучих материалов. На данном этапе определяются неудовлетворительные свойства, которые не позволяют осуществить технологию прямого прессования. На основании данных свойств производится подбор ВВ таким образом, чтобы именно эти свойства были компенсированы. На последнем этапе производится расчет количества основного ВВ, выполняющего роль наполнителя и обеспечивающего для таблеточной смеси оптимальные технологические свойства [10–13].

Для применения метода SeDeM необходимо изучить параметры, определяющие размерность частиц, прессуемость, степень сыпучести, стабильность вещества. Для корректного изучения данных свойств

прибегают к методикам, описанным в нормативной документации – Государственной Фармакопеей РФ XIV изд., Фармакопеей Евразийского экономического союза, European Pharmacopoeia 9th Ed. и т. д. [14–16]. В дальнейшем изученные параметры переводят в радиусы, которые откладывают на радиальной диаграмме для получения наглядного изображения пригодности материала для прямого прессования. Радиус при этом может находиться в интервале от 0 до 10. Полученные радиусы используются также для расчетов математических индексов, характеризующих пригодность материалов для прямого прессования, и для определения количества ВВ, необходимого для получения оптимальной таблеточной смеси [17–19].

Целью работы являлось прогнозирование составов матричных таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с пролонгированным высвобождением, получаемых путем прямого прессования с использованием метода математического моделирования SeDeM.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлась оригинальная АФС 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, а также вспомогательные вещества:

- Methocel K4M – гипромеллоза, производное целлюлозы (Dow, Германия);
- Kollidon SR – сополимер поливинилацетата и поливинола (BASF, Германия);
- Kollicoat IR – сополимер полиэтиленгликоля и поливинилового спирта (BASF, Германия);
- Kollicoat MAE 100P – сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (BASF, Германия);
- Eudragit L100-55 – сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (Evonik, Германия);
- Protanal PH 6160 – натрия альгинат (DuPont, США);
- лактоза моногидрат SuperTab 30GR (DFE Pharma, Германия);
- магния стеарат фармакопейный (LekkoStyle, Россия).

На момент исследования АФИ и ВВ имели не истекшие сроки годности.

АФС представляет собой производное малоновой кислоты, что обуславливает антистепатозное, гепатопротекторное и антиоксидантное действие вещества. Данный объект представляет интерес в качестве препарата для лечения неалкогольной жировой болезни печени. В качестве ЛФ для представленной АФС были выбраны матричные таблетки с пролонгированным высвобождением.

Используемые в исследовании полимеры применяются в технологии таблеток с пролонгированным высвобождением в качестве матрицеобразующих компонентов.

Физико-химические и технологические свойства АФС, ВВ, полученных модельных таблеточных смесей, а также свойства полученных таблеток были изучены в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд. и ЕР 9th ed.

Гигроскопичность субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия определяли в соответствии с требованиями ЕР 9th ed. в климатической камере постоянных условий Memmert HPP 110 (Memmert, Германия), при температуре 25 °C и относительной влажности 80 % на 24 ч. Измеряли прирост массы через 24 часа.

Измерение насыпной плотности (D_a) и насыпной плотности после уплотнения (D_c) порошка проводили с использованием тестера насыпной плотности ERWEKA SVM 221 (ERWEKA GmbH, Германия) в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков».

Число Хауснера (IH) является косвенной характеристикой степени сыпучести порошка и рассчитывается по формуле 1:

$$IH = \frac{D_c}{D_a}. \quad (1)$$

Индекс Карра (CI) также является характеристикой сыпучести и степени сжимаемости порошка. Расчет индекса Карра производится по формуле 2:

$$CI = \frac{D_c - D_a}{D_c} \cdot 100 \%. \quad (2)$$

Внутренняя пористость (le) определяется как пространство между частицами порошка. Пористость между частицами рассчитывается по формуле 3:

$$le = \left(\frac{D_c - D_a}{D_c \cdot D_a} \right). \quad (3)$$

Сыпучесть ("t") субстанции (скорость протекания порошка через отверстие) определяли в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» при помощи тестера сыпучести ERWEKA GTD-63150 (ERWEKA GmbH, Германия), снабженного металлической воронкой с затвором, приемной емкостью и весами.

Угол естественного откоса (a) является дополнительной характеристикой сыпучести. Определение проводили в тех же условиях и на том же оборудовании, что и определение сыпучести.

Коэффициент прессуемости (Icd) определяется как степень порошка к когезии, т. е. способность порошка спрессовываться при определенном давлении с образованием прочной таблетки. Для определения коэффициента прессуемости около 0,3 г субстанции (точная навеска) помещали в матрицу гидравлического ручного пресса и спрессовывали в таблетку при давлении прессования 1200 кгс/см². Далее определяли прочность полученной таблетки на раздавливание с использованием тестера твердости таблеток Erweka TBN 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия). Полученное значение прочности (H) принимали за коэффициент прессуемости порошка.

Потерю в массе при высушивании (%HR) определяли в соответствии с ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». Для проведения испытания использовали сушильный шкаф с принудительной конвекцией OF-12G (JeioTech, Южная Корея).

Определение фракционного состава и массовой доли частиц с размером менее 50 мкм (%Pf) проводили путем ситового анализа в соответствии с ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ». При проведении испытания использовали лабораторные весы Sartorius LA 16001S (Sartorius, Россия) и вибропросеиватель CISA RP 200N (Cisa, Испания).

Индекс гомогенности ($I\theta$) рассчитывали из полученных данных ситового анализа и определяли однородность частиц в ней. Расчет индекса производили по формуле 4:

$$I\theta = \frac{F_m}{100 + (d_m - d_{m-1}) \cdot F_{m-1} + (d_{m+1} - d_m) \cdot F_{m+1} + (d_m - d_{m-2}) \cdot F_{m-2} + (d_{m+2} - d_m) \cdot F_{m+2} + \dots + (d_m - d_{m-n}) \cdot F_{m-n} + (d_{m+n} - d_m) \cdot F_{m+n}}, \quad (4)$$

где F_m – количество частиц с преобладающим размером; F_{m-1} – количество частиц с размером менее преобладающего; F_{m+1} – количество частиц с размером более преобладающего; n – порядковый номер исследуемой фракции в серии по отношению к преобладающей фракции; d_m – средний диаметр частиц в основной фракции; d_{m-1} – средний диаметр частиц во фракции диапазона, непосредственно ниже диапазона большинства; d_{m+1} – средний диаметр частиц во фракции диапазона, непосредственно превышающего диапазон большинства.

Для приведения значений изученных показателей в радиусы диаграммы SeDeM использовали формулы, представленные в таблице 1.

После расчетов радиусов для АФС и ВВ были определяли математические индексы: параметрический индекс [формула (5)] и параметрический индекс профиля [формула (6)].

$$IP = \frac{nP \geq 5}{nPt}, \quad (5)$$

где $nP \geq 5$ – количество параметров с радиусом более или равным пяти; nPt – общее количество изученных параметров.

$$IPP = \frac{\sum r}{nPt} IPP = \frac{\sum r}{nPt}, \quad (6)$$

где $\sum r$ – сумма радиусов всех изученных параметров.

Допустимое предельное значение индекса: $IPP \geq 5/IPP \geq 5$.

На основании полученных данных производили расчет требуемых количеств полимеров по формуле (7) [3].

$$CP = 100 - \frac{(RE - R)}{(RE - RP)} \cdot 100, \quad (7)$$

где CP – процентное содержание корректирующего вспомогательного вещества; RE – среднее значение радиусов группы параметров ВВ; R – требуемое среднее значение радиусов группы параметров; RP – среднее значение радиусов группы параметров АФИ, требующих корректировки.

Таблица 1. Параметры сыпучего материала и перевод значений в радиусы

Table 1. Parameters of powder material and conversion of values to radius

Параметр Parameter	Предельное значение (v) Value (v)	Радиус (r) Radius (r)	Перевод значения v в радиус r Convert value v to radius r
Насыпная плотность (D_a) Bulk density (D_a)	0–1	0–10	10v
Насыпная плотность после уплотнения (D_c) Tapped density (D_c)	0–1	0–10	10v
Внутренняя пористость (le) Inter-particle porosity (le)	0–1.2	0–10	10v/1.2
Индекс Карра (IC) Carr Index (IC)	0–50	0–10	v/5
Коэффициент прессуемости (lcd) Cohesion Index (lcd)	0–200	0–10	v/20
Число Хауснера (IH) Hausner ratio (IH)	3–1	0–10	(30–10v)/2
Угол естественного откоса (α) Angle of repose (α)	50–0	0–10	10–(v/5)
Сыпучесть (t'') Flowability (t'')	20–0	0–10	10–(v/2)
Потеря в массе при высушивании (%HR) Loss on drying (%HR)	10–0	0–10	10–v
Гигроскопичность (%H) Hygroscopicity (%H)	20–0	0–10	10–(v/2)
Частицы размером менее 50 мкм (%Pf) Particle size 50 μ m (%Pf)	50–0	0–10	10–(v/5)
Гомогенность ($I\theta$) Homogeneity Index ($I\theta$)	$(0–2) \times 10^{-2}$	0–10	500v

В соответствии с рассчитанными составами, готовили таблеточные смеси. Расчетные количества компонентов смеси для каждого состава просеивали на сите с размером отверстий 0,5 мм, по мере необходимости проводили измельчение и повторяли просеивание. Для просеивания применяли вибропросеиватель RP200N (Cisa, Испания). Навески компонентов помещали на сито, устанавливали приемную чашу и крышку и помещали на вибропросеиватель. Устанавливали амплитуду 2,5 см и просеивали в течение 5 мин. Подготовленные компоненты, кроме стеарата магния, помещали в смеситель типа «пьяная бочка» DGN-II (Unique Machinery, Китай) и перемешивали в течение 10 мин со скоростью вращения ротора 45 об/мин. Полученную смесь компонентов просеивали на сите с размером отверстий 0,5 мм аналогично процедуре,

описанной выше. Проводили контроль однородности смешения визуально и при необходимости повторяли процедуру смешения и просеивания. Полученную смесь помещали обратно в смеситель, добавляли стеарат магния и опудривали смесь в течение 5 мин при 45 об/мин. Проводили визуально контроль однородности смеси и при необходимости полученную таблеточную смесь просеивали через сито с размером отверстий 0,5 мм.

Для полученных таблеточных смесей проводили контроль технологических свойств: насыпная плотность, насыпная плотность после уплотнения, индекс Карра, число Хауснера, прессуемость, сыпучесть, угол естественного откоса, в соответствии с описанными выше методиками.

Из полученных смесей прессовали двояковыпуклые таблетки диаметром 10 мм и массой 360 мг. Прессование производили на однопуансонном таблеточном прессе ERWEKA EP-1 (ERWEKA GmbH, Германия).

Полученные таблетки оценивали по стандартным показателям качества: внешний вид, однородность массы, прочность на раздавливание и истираемость.

Внешний вид таблеток оценивали визуально в соответствии с испытанием «Описание», изложенным в ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».

Однородность массы полученных таблеток определяли на аналитических весах Sartorius CE224-C (Sartorius, Россия) в соответствии с методикой, изложенной в ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Прочность на раздавливание таблеток определяли по методике, описанной в ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» при помощи тестера прочности таблеток ERWEKA TBH125TDP (ERWEKA GmbH, Германия).

Истираемость таблеток определяли на тестере ERWEKA TAR220 (ERWEKA GmbH, Германия) в барабане с 12 лопастями в соответствии с методикой, описанной в ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения полученных радиусов для АФС и используемых полимеров представлены в таблице 2.

Анализ полученных данных показал, что субстанция не пригодна для прямого прессования т. к. не обладает сыпучестью. По результатам применения метода SeDeM установлено, что прессуемость субстанции не позволяет осуществить прямое прессование. Расчитанные параметрические индексы также подтверждают непригодность субстанции для прямого прессования. Значения параметрического индекса IP = 0,33 (<0,5) и параметрического индекса профиля IPP = 4,00 (<5) не соответствуют минимальным допустимым значениям, следовательно, 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoат натрия не подходит для прямого прессования.

Таким образом, для осуществления технологии прямого прессования необходимо использовать ВВ, которые позволили бы улучшить прессуемость и сыпучесть 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия.

На основании полученных радиусов была построена диаграмма SeDeM для АФС и полимеров (рисунок 1).

Диаграмма SeDeM представляет собой 12-стронний многоугольник, позволяющая наглядно оценить пригодность материала для прямого прессования. Чем больше площадь полученного многоугольника, тем более порошкообразный материал пригоден для прямого прессования.

Таблица 2. Значения радиусов АФС и полимеров для построения диаграммы SeDeM

Table 2. Values of API and polymer radius for constructing the SeDeM diagram

Параметр Parameter	4,4'-(пропандиамидо) дibenzoат натрия Sodium 4,4'-(propandiamido) dibenzoate	Methocel K4M	Kollidon SR	Kollicoat MAE 100P	Eudragit L100-55	Protanal PH 6160
D_{σ} , г/мл D_{σ} , g/ml	4,89	1,11	2,53	3,20	3,50	3,40
D_{σ} , г/мл D_{σ} , g/ml	6,51	2,01	3,43	3,80	4,40	3,90
le	4,27	3,36	8,64	0,42	0,58	0,33
IC, %	5,00	8,96	5,25	3,20	4,00	2,33
Icd, H	4,05	6,80	6,91	5,10	5,45	4,55
IH	8,35	3,97	5,48	9,05	8,75	9,35
α , °	1,60	0,60	6,04	6,00	6,00	5,60
t'' , сек/100 г t'' , sec/100 g	0,00	1,75	5,25	6,07	8,96	7,60
%HR, %	3,98	8,60	3,19	6,12	6,56	6,05
%H, %	6,70	9,98	2,85	4,90	5,17	4,99
%Pf, %	0,80	5,40	8,40	8,06	8,36	8,27
Iθ	2,00	5,50	5,50	5,00	5,00	10
IP	0,33	0,50	0,66	0,58	0,66	0,50
IPP	4,00	4,48	5,28	5,07	5,56	5,53

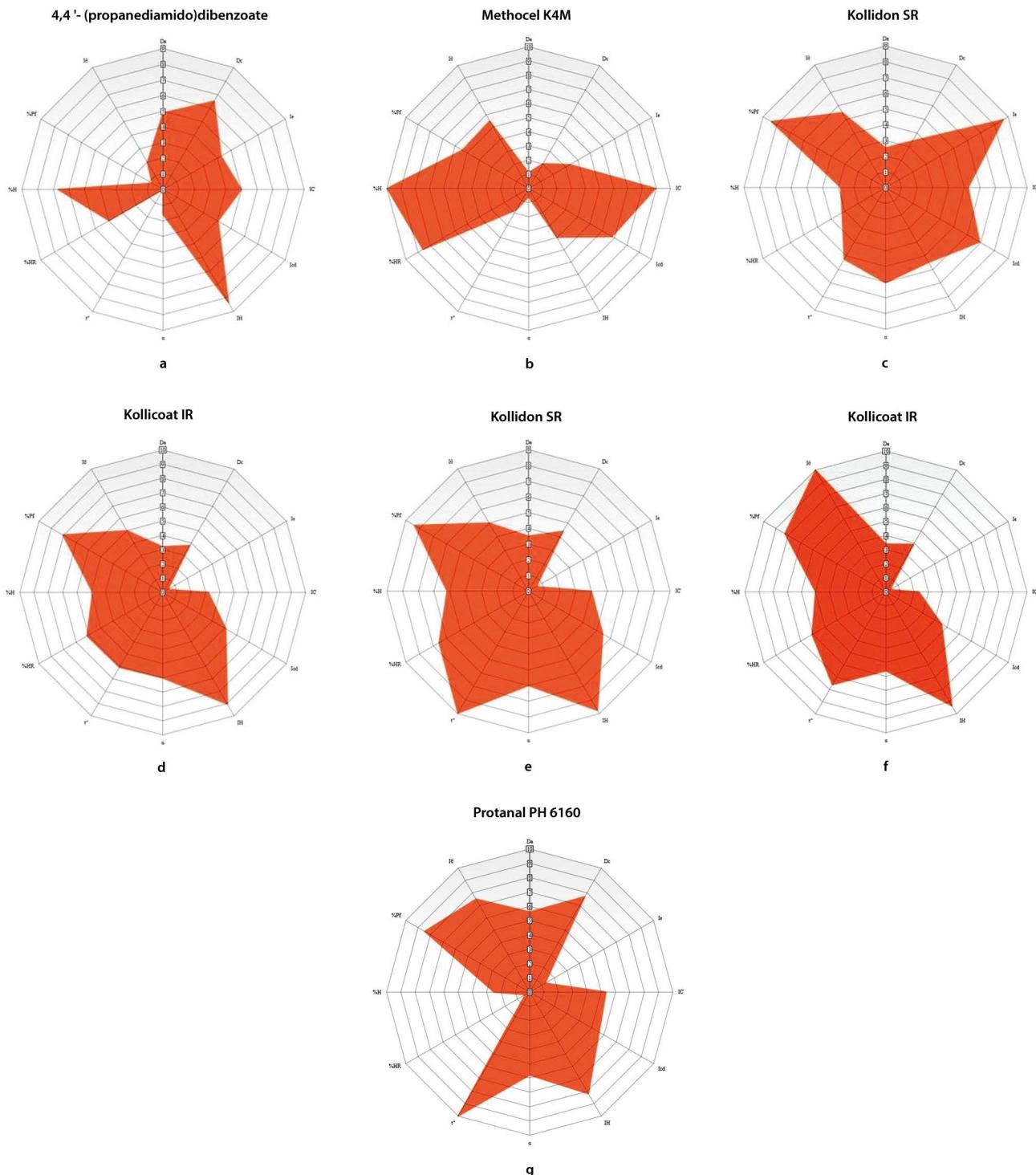


Рисунок 1. Диаграмма SeDeM для 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия (а); ГПМЦ Methocel K4M (б); Kollidon SR (в); Kollicoat IR (д); Kollicoat MAE 100P (е); Eudragit L100-55 (ф) и Protanal PH 6160 (г)

Figure 1. SeDeM diagram for sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate (a); HPMC Methocel K4M (b); Kollidon SR (c); Kollicoat IR (d); Kollicoat MAE 100P (e); Eudragit L100-55 (f) and Protanal PH 6160 (g)

ГПМЦ Methocel K4M обладала хорошей прессуемостью, однако не обладала достаточной сыпучестью. В аналогичном исследовании J. Sauri и соавт. были изучены свойства ГМПЦ торгового наименования HPMC K15M Premium, которая также показала не-

удовлетворительную сыпучесть. С увеличением количества данной ГПМЦ в составе технологические свойства таблеточных смесей ухудшались [17].

Другие исследуемые полимеры обладали достаточной сыпучестью и прессуемостью для осущест-

вления технологии прямого прессования. Далее производили расчет требуемого количества полиме-ра по формуле (7). В качестве основания для расче-тов использовали средние значение радиусов груп-пы показателей, определяющих сыпучесть. Состав, содержащий Methocel K4M, нуждался в дополнительной корректировке, т. к. по результатам иссле-дований ГПМЦ обладала неудовлетворительной сы-пучестью. Поэтому для данного состава был проведен расчет ГПМЦ по группе параметров, определяющих прессуемость.

Также в составы таблеток добавляли опудриваю-щий агент, стеарат магния, в количестве 1 % от массы таблетки и наполнитель лактозу SuperTab 30GR до получения необходимой массы таблетки (360 мг). Со-ставы модельных таблеточных смесей с расчетными количествами АФИ и ВВ представлены в таблице 3.

Результаты изучения технологических характе-ристик таблеточных смесей представлены в таблице 4.

Все таблеточные смеси обладали удовлетвори-тельными технологическими свойствами и позволяют осуществить технологию прямого прессования. Одна-ко, среди представленных составов худшими свойст-вами обладает состав, содержащий Protanal PH6160.

Лактоза торгового наименования SuperTab 30 GR дополнительно введенная в состав, содержащий Methocel K4M, позволила нивелировать неудовлетво-рительную сыпучесть как 4,4'-(пропандиамидо)дибен-зоата натрия, так и ГПМЦ.

Результаты контроля качества полученных таб-леток представлены в таблице 5. Выбор параметров качества для оценки пригодности метода SeDeM в прогнозировании составов таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия был прове-ден на основании данных, полученных в подобных

Таблица 3. Составы таблеточных смесей

Table 3. Compositions of tablet mixtures

Компонент, % Ingredient, %	Состав 1 Mixture 1	Состав 2 Mixture 2	Состав 3 Mixture 3	Состав 4 Mixture 4	Состав 5 Mixture 5	Состав 6 Mixture 6
4,4'-(пропандиамидо)- дибензоат натрия Sodium 4,4'-(propandiamido) dibenzoate	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Methocel K4M	27,78					
SuperTab 30GR	21,22	13,00	24,00	1,78	2,90	1,00
Kollidon SR		36,00				
Kollicoat IR			25,00			
Kollicoat MAE 100P				47,22		
Eudragit L100-55					46,10	
Protanal PH6160						48,00
Стеарат магния Magnesium stearate	1,00	1,00	1,00	1,00	1,0	1,0
Итого Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Таблица 4. Технологические свойства таблеточных смесей

Table 4. Technological properties of tablet mixtures

Параметры смеси Parameter	Состав 1 Mixture 1	Состав 2 Mixture 2	Состав 3 Mixture 3	Состав 4 Mixture 4	Состав 5 Mixture 5	Состав 6 Mixture 6
Насыпная плотность, г/мл Bulk density, g/ml	0,55 ± 0,09	0,43 ± 0,07	0,61 ± 0,08	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,42 ± 0,06
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Tapped density, g/ml	0,67 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,74 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,70 ± 0,03
Индекс Карра, % Carr Index, %	17,9	23,2	17,6	21,3	19,6	32,6
Прессуемость Cohesion Index	105	108	102	105	103	116
Число Хауснера Hausner ratio	1,22	1,30	1,21	1,27	1,24	1,49
Угол естественного откоса, ° Angle of repose, °	32,5 ± 0,5	35,3 ± 0,6	34,0 ± 0,6	32,3 ± 0,4	34,0 ± 0,3	39,6 ± 0,3
Сыпучесть, сек/100г Flowability, s/100g	5,1 ± 0,08	9,4 ± 0,02	9,3 ± 0,10	8,3 ± 0,05	10,6 ± 0,04	12,3 ± 0,05

Таблица 5. Результаты контроля качества таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия

Table 5. Results of quality control of tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate

Показатель качества Quality control parameter	Состав 1 Mixture 1	Состав 2 Mixture 2	Состав 3 Mixture 3	Состав 4 Mixture 4	Состав 5 Mixture 5	Состав 6 Mixture 6
Внешний вид Appearance	Белые, круглые, двояко-выпуклые, без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks	Белые, круглые, двояко-выпуклые, без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks	Белые, круглые, двояко-выпуклые, без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks	Белые, круглые, двояко-выпуклые, без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks	Белые, круглые, двояко-выпуклые, без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks	Белые, круглые, двояко-выпуклые, без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks
Однородность массы, г Mass homogeneity, g	0,361 ± 0,009	0,360 ± 0,03	0,362 ± 0,05	0,361 ± 0,04	0,359 ± 0,02	0,357 ± 0,04
Прочность на раздавливание, Н Crushing strength, N	44 ± 3	40 ± 2	68 ± 4	68 ± 3	68 ± 3	91 ± 4
Истираемость, % Abrasion, %	0,05	0,03	0,03	0,04	0,04	0,02

экспериментах, связанных с разработкой таблеток. Так, например, в эксперименте, проведенном А. Н. Голубевым и соавт. показатели прочности на раздавливание и истираемости были выбраны как основные критические атрибуты качества (CQA) [20]. Эти же показатели были применены в качестве критерии при разработке состава таблеток в эксперименте, проведенном О. А. Терентьевой и соавтю [21]. Также решено было определить внешний вид и однородность массы таблеток, так как данные показатели качества могут быть косвенно связаны со степенью сыпучести полученных ранее таблеточных смесей.

Полученные таблетки удовлетворяют фармакопейным требованиям к качеству данной лекарственной формы. Таким образом, метод SeDeM показал свою пригодность для разработки составов таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия. Однако окончательный состав необходимо обосновать изучением кинетики высвобождения АФС из ЛФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена предварительная разработка состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе оригинальной субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с применением метода SeDeM. С помощью данного метода удалось сократить количество проводимых экспериментальных работ, связанных с подбором количества ВВ для нивелирования неудовлетворительных свойств АФС, не позволяющих получить требуемую ЛФ путем прямого прессования. Полученные в ходе исследования таблеточные смеси соответствовали необходимым технологическим характеристикам, а полученные таблетки обладали удовлетворительным качеством. Таким образом, метод SeDeM является пригодным для разработки состава таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. EMEA, 2004. Guideline on ICH Topic Q8, Note for Guidance on Pharmaceutical Development, EMEA/CHMP/167068/2004.
2. Suñé Negre, J. M. Pérez Lozano P., Miñarro M., Roig M., Fuster R., Hernandez C., Ruhi R., Garcia-Montoya E., Tico J. R. Application of the SeDeM diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics.* 2008;69:1029–1039. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.01.020.
3. Suñé Negre J. M., Garcia-Montoya E., Pérez Lozano P., Aguilar-Díaz J., Roig Carreras M., Fuster R., Miñarro M., Tico J. R. SeDeM diagram: a new expert system for the formulation of drugs in solid form. *Expert Systems for Human, Materials and Automation.* 2011;1:17–34. DOI: 10.13140/2.1.4848.9923.
4. Nofrarias I., Nardi A., Sune-Pou M., Suñé-Negre J. M., Garcia-Montoya E., Pérez-Lozano P., Tico J. R., Miñarro M. Comparison between Microcrystalline Cellulose of different grades made by four manufacturers using SeDeM diagram expert system as a pharmaceutical characterization tool. *Powder Technology.* 2019;342:780–788. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.048.
5. Sipos E., Andrea R. O., Zoltan-Istvan S., Emoke-Margit R., Gabriella Donath N. Application of SeDeM expert systems in preformulation studies of pediatric ibuprofen ODT tablets. *Acta Pharmaceutica.* 2017;67:237–246. DOI: 10.1515/acph-2017-0017.
6. Nardi-Ricat A., Nofrarias-Roig I., Sune-Pou M., Pérez-Lozano P., Miñarro-Carmona M., Garcia-Montoya E., Tico Grau J. R., Insa Boronat R., Suñé-Negre J. M. Formulation of sustained release hydrophilic matrix tablets of tolcapone with the application of SeDeM diagram: influence of tolcapone's particle size on sustained release. *Pharmaceutics.* 2020;12(7):674. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070674.
7. Kotsur Yu. M., Flisjuk E. V. Application of the SeDeM method for optimization of tablet formulations (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2021;55:290–294. DOI: 10.1007/s11094-021-02413-0.
8. Hamman H., Hamman J., Wessels A., Scholtz J., Steenekamp J. Development of multiple-unit pellet system tablets by employing the SeDeM expert diagram system II: pellets containing different active pharmaceutical ingredients. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2019;24(2):145–156. DOI: 10.1080/10837450.2018.1435691.
9. Vasiljevic I., Turkovic E., Nenadovic S., Mirkovic M., Zimmer A., Parojcic J., Alekovic I. Investigation into liquisolid system processability based on the SeDeM Expert System approach. *International Journal of Pharmaceutics.* 2021;605:120847. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120847.
10. Salim I., Olowosulu A. K., Abdulsamad A., Gwarzo M. S., Khalid G. M., Ahmad N. T., Eichie F. E., Kurfi F. S. Application of SeDeM Expert System in the development of novel directly compressible co-processed excipients via co-processing. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2021;7(1). DOI: 10.1186/s43094-021-00253-z.

11. Suñé-Negre J. M., Pérez-Lozano P., Miñarro M., Roig M., Fuster R., Hernandez C., Ruhi R., Garcia-Montoya E., Tico J. R. Optimization of parameters of the SeDeM Diagram Expert System: Hausner index (HI) and Relative Humidity (%RH). *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2011;79(2):464–472. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.04.002.
12. Aguilera-Díaz J. E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé Negre J. M., Miñarro M., Tico J. R. The use of the SeDeM Diagram expert system to determine the suitability of diluents-desintegrant for direct compression and their use in information of ODT. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2009;73:414–423. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.07.001.
13. Bhaysar P. H., Bhatt B., Oza C., Trivedi S., Shah S. A review on: SeDeM expert system in formulation development of pharmaceutical forms. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*. 2015;5(4):363–369.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 14.10.2021.
15. Фармакопея Евразийского экономического союза. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Ссылка активна на 14.10.2021.
16. European Pharmacopoeia. 9th edition. – Strasbourg: Council of Europe, 2016.
17. Sauri J. Millam D., Suñé-Negre J., Pérez-Lozano P., Sarrate R., Fabregas A., Carrillo C., Miñarro M., Tico J. R. The use of the SeDeM diagram expert system for the formulation of Captopril SR matrix tablets by direct compression. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;461:38–45. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.029.
18. Aguilera-Díaz, J. E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J., Miñarro M., Tico J. R. SeDeM expert system a new innovator tool to develop pharmaceutical forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;40:222–236. DOI: 10.3109/03639045.2012.756007.
19. Tadwee I., Shahi S. Formulation development of losartan potassium immediate release tablets and process optimization using SeDeM expert system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018;8(2):33–43. DOI: 10.7324/JAPS.2018.8205.
20. Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):45–48. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
21. Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):18–22. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
6. Nardi-Ricat A., Nofrarias-Roig I., Sune-Pou M., Pérez-Lozano P., Miñarro-Carmona M., Garcia-Montoya E., Tico-Grau J. R., Insa-Boronat R., Suñé-Negre J. M. Formulation of sustained release hydrophilic matrix tablets of tolcapone with the application of SeDeM diagram: influence of tolcapone's particle size on sustained release. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):674. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070674.
7. Kotsur Yu. M., Flisjuk E. V. Application of the SeDeM method for optimization of tablet formulations (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55:290–294. DOI: 10.1007/s11094-021-02413-0.
8. Hamman H., Hamman J., Wessels A., Scholtz J., Steenekamp J. Development of multiple-unit pellet system tablets by employing the SeDeM expert diagram system II: pellets containing different active pharmaceutical ingredients. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24(2):145–156. DOI: 10.1080/10837450.2018.1435691.
9. Vasiljevic I., Turkovic E., Nenadovic S., Mirkovic M., Zimmer A., Parojcic J., Alekscic I. Investigation into liquisolid system processability based on the SeDeM Expert System approach. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;605:120847. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120847.
10. Salim I., Olowosulu A. K., Abdulsamad A., Gwarzo M. S., Khalid G. M., Ahmad N. T., Echie F. E., Kurfi F. S. Application of SeDeM Expert System in the development of novel directly compressible co-processed excipients via co-processing. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;7(1). DOI: 10.1186/s43094-021-00253-z.
11. Suñé-Negre J. M., Pérez-Lozano P., Miñarro M., Roig M., Fuster R., Hernandez C., Ruhi R., Garcia-Montoya E., Tico J. R. Optimization of parameters of the SeDeM Diagram Expert System: Hausner index (HI) and Relative Humidity (%RH). *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2011;79(2):464–472. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.04.002.
12. Aguilera-Díaz J. E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé Negre J. M., Miñarro M., Tico J. R. The use of the SeDeM Diagram expert system to determine the suitability of diluents-desintegrant for direct compression and their use in information of ODT. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2009;73:414–423. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.07.001.
13. Bhaysar P. H., Bhatt B., Oza C., Trivedi S., Shah S. A review on: SeDeM expert system in formulation development of pharmaceutical forms. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*. 2015;5(4):363–369.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издания. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 14.10.2021. (In Russ.)
15. Farmakopeya Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza [Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Accessed: 14.10.2021. (In Russ.)
16. European Pharmacopoeia. 9th edition. – Strasbourg: Council of Europe, 2016.
17. Sauri J. Millam D., Suñé-Negre J., Pérez-Lozano P., Sarrate R., Fabregas A., Carrillo C., Miñarro M., Tico J. R. The use of the SeDeM diagram expert system for the formulation of Captopril SR matrix tablets by direct compression. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;461:38–45. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.029.
18. Aguilera-Díaz, J. E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J., Miñarro M., Tico J. R. SeDeM expert system a new innovator tool to develop pharmaceutical forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;40:222–236. DOI: 10.3109/03639045.2012.756007.
19. Tadwee I., Shahi S. Formulation development of losartan potassium immediate release tablets and process optimization using SeDeM expert system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018;8(2):33–43. DOI: 10.7324/JAPS.2018.8205.
20. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):45–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
21. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the Composition and Technology of New Neuroprotective Drug Tablets Using Fractional Factorial Design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.

REFERENCES

1. EMEA, 2004. Guideline on ICH Topic Q8, Note for Guidance on Pharmaceutical Development, EMEA/CHMP/167068/2004.
2. Suñé Negre, J. M. Pérez-Lozano P., Miñarro M., Roig M., Fuster R., Hernandez C., Ruhi R., Garcia-Montoya E., Tico J. R. Application of the SeDeM diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2008;69:1029–1039. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.01.020.
3. Suñé Negre J. M., Garcia-Montoya E., Pérez-Lozano P., Aguilera-Díaz J., Roig Carreras M., Fuster R., Miñarro M., Tico J. R. SeDeM diagram: a new expert system for the formulation of drugs in solid form. *Expert Systems for Human, Materials and Automation*. 2011;1:17–34. DOI: 10.13140/2.1.4848.9923.
4. Nofrarias I., Nardi A., Sune-Pou M., Suñé-Negre J. M., Garcia-Montoya E., Pérez-Lozano P., Tico J. R., Miñarro M. Comparison between Microcrystalline Cellulose of different grades made by four manufacturers using SeDeM diagram expert system as a pharmaceutical characterization tool. *Powder Technology*. 2019;342:780–788. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.048.
5. Sipos E., Andrea R. O., Zoltan-Istvan S., Emoke-Margit R., Gabriella Donath N. Application of SeDeM expert systems in preformulation studies of pediatric ibuprofen ODT tablets. *Acta Pharmaceutica*. 2017;67:237–246. DOI: 10.1515/acph-2017-0017.
1. EMEA, 2004. Guideline on ICH Topic Q8, Note for Guidance on Pharmaceutical Development, EMEA/CHMP/167068/2004.
2. Suñé Negre, J. M. Pérez-Lozano P., Miñarro M., Roig M., Fuster R., Hernandez C., Ruhi R., Garcia-Montoya E., Tico J. R. Application of the SeDeM diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2008;69:1029–1039. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.01.020.
3. Suñé Negre J. M., Garcia-Montoya E., Pérez-Lozano P., Aguilera-Díaz J., Roig Carreras M., Fuster R., Miñarro M., Tico J. R. SeDeM diagram: a new expert system for the formulation of drugs in solid form. *Expert Systems for Human, Materials and Automation*. 2011;1:17–34. DOI: 10.13140/2.1.4848.9923.
4. Nofrarias I., Nardi A., Sune-Pou M., Suñé-Negre J. M., Garcia-Montoya E., Pérez-Lozano P., Tico J. R., Miñarro M. Comparison between Microcrystalline Cellulose of different grades made by four manufacturers using SeDeM diagram expert system as a pharmaceutical characterization tool. *Powder Technology*. 2019;342:780–788. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.048.
5. Sipos E., Andrea R. O., Zoltan-Istvan S., Emoke-Margit R., Gabriella Donath N. Application of SeDeM expert systems in preformulation studies of pediatric ibuprofen ODT tablets. *Acta Pharmaceutica*. 2017;67:237–246. DOI: 10.1515/acph-2017-0017.
6. Nardi-Ricat A., Nofrarias-Roig I., Sune-Pou M., Pérez-Lozano P., Miñarro-Carmona M., Garcia-Montoya E., Tico-Grau J. R., Insa-Boronat R., Suñé-Negre J. M. Formulation of sustained release hydrophilic matrix tablets of tolcapone with the application of SeDeM diagram: influence of tolcapone's particle size on sustained release. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):674. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070674.
7. Kotsur Yu. M., Flisjuk E. V. Application of the SeDeM method for optimization of tablet formulations (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55:290–294. DOI: 10.1007/s11094-021-02413-0.
8. Hamman H., Hamman J., Wessels A., Scholtz J., Steenekamp J. Development of multiple-unit pellet system tablets by employing the SeDeM expert diagram system II: pellets containing different active pharmaceutical ingredients. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24(2):145–156. DOI: 10.1080/10837450.2018.1435691.
9. Vasiljevic I., Turkovic E., Nenadovic S., Mirkovic M., Zimmer A., Parojcic J., Alekscic I. Investigation into liquisolid system processability based on the SeDeM Expert System approach. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;605:120847. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120847.
10. Salim I., Olowosulu A. K., Abdulsamad A., Gwarzo M. S., Khalid G. M., Ahmad N. T., Echie F. E., Kurfi F. S. Application of SeDeM Expert System in the development of novel directly compressible co-processed excipients via co-processing. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;7(1). DOI: 10.1186/s43094-021-00253-z.
11. Suñé-Negre J. M., Pérez-Lozano P., Miñarro M., Roig M., Fuster R., Hernandez C., Ruhi R., Garcia-Montoya E., Tico J. R. Optimization of parameters of the SeDeM Diagram Expert System: Hausner index (HI) and Relative Humidity (%RH). *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2011;79(2):464–472. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.04.002.
12. Aguilera-Díaz J. E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé Negre J. M., Miñarro M., Tico J. R. The use of the SeDeM Diagram expert system to determine the suitability of diluents-desintegrant for direct compression and their use in information of ODT. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2009;73:414–423. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.07.001.
13. Bhaysar P. H., Bhatt B., Oza C., Trivedi S., Shah S. A review on: SeDeM expert system in formulation development of pharmaceutical forms. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*. 2015;5(4):363–369.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издания. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 14.10.2021. (In Russ.)
15. Farmakopeya Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza [Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Accessed: 14.10.2021. (In Russ.)
16. European Pharmacopoeia. 9th edition. – Strasbourg: Council of Europe, 2016.
17. Sauri J. Millam D., Suñé-Negre J., Pérez-Lozano P., Sarrate R., Fabregas A., Carrillo C., Miñarro M., Tico J. R. The use of the SeDeM diagram expert system for the formulation of Captopril SR matrix tablets by direct compression. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;461:38–45. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.029.
18. Aguilera-Díaz, J. E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Suñé-Negre J., Miñarro M., Tico J. R. SeDeM expert system a new innovator tool to develop pharmaceutical forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;40:222–236. DOI: 10.3109/03639045.2012.756007.
19. Tadwee I., Shahi S. Formulation development of losartan potassium immediate release tablets and process optimization using SeDeM expert system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018;8(2):33–43. DOI: 10.7324/JAPS.2018.8205.
20. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):45–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
21. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the Composition and Technology of New Neuroprotective Drug Tablets Using Fractional Factorial Design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.



Экспериментальное обоснование состава желатиновой массы для получения капсул с эфирными маслами

Е. И. Молохова¹, Е. И. Пономарева¹, Ю. В. Сорокина^{1*}, И. В. Алексеева¹, Т. Е. Рюмина¹,
В. В. Новикова¹, А. Л. Голованенко¹, Е. С. Березина¹, Ю. М. Ладутько²

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Сорокина Юлия Васильевна. E-mail: sorokinayulia@yandex.ru

ORCID: Е. И. Молохова – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>; Е. И. Пономарева – <https://orcid.org/0000-0002-3407-3879>; Ю. В. Сорокина – <https://orcid.org/0000-0001-9114-7208>;

И. В. Алексеева – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>; Т. Е. Рюмина – <https://orcid.org/0000-0002-7084-5602>; В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>;

А. Л. Голованенко – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>; Е. С. Березина – <https://orcid.org/10000-0002-4122-2414>; Ю. М. Ладутько – <https://orcid.org/0000-0001-5741-4050>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 29.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Перспективной лекарственной формой, включающей эфирные масла в качестве действующих веществ, являются мягкие желатиновые капсулы. Совместными исследованиями сотрудников Пермской государственной фармацевтической академии, исследовательского института питания Министерства энергетики и промышленности Республики Таджикистан предложен состав желатиновой массы для капсулирования ротационно-матричным методом. Определены необходимые для сохранения прочности и эластичности оболочки капсулы во время производственного процесса и хранения механические и физико-технологические параметры.

Цель. Изучение реологических свойств желатиновых масс на основе желатина разных марок, а также миграции эфирных масел через капсулные оболочки.

Материалы и методы. В качестве действующих веществ, вводимых в состав мягких желатиновых капсул, использовали фармацевтические активные субстанции «Липовитол» и «Лимонеол», полученные в Республике Таджикистан. В качестве растворителя применяли подсолнечное масло. Для получения желатиновых масс использовали образцы желатина: 1 – Foodchem (Китай), 2 – BrodnickieZakladZelatynySp. zo.o. (Польша), 3 – Italgelatines.p.a. (Италия), 4 – Ewald-Gelatine GmbH (Германия), 5 – WeishardtInternational (Франция); глицерин; масло подсолнечное. Желатиновую массу для производства мягких капсул готовили в закрытом реакторе. Капсулы получали на автоматической линии для капсулирования RJWJ – 115 SoftGelatinEncapsulatorMachine (Китай). Структурно-механические свойства мягких желатиновых масс определяли на ротационном вискозиметре «Reotest 2» типа RV (Германия). Динамику процесса миграции эфирных масел и его компонентов изучали по изменению их количества в капсule хромато-масс-спектрометрическим методом на хроматографе Varian CP 3800 с квадрупольным масс-спектрометром 4000 MS в качестве детектора (США).

Результаты и обсуждение. При изучении реологических свойств модельных композиций установлено, что для всех образцов желатиновых масс характерно уменьшение значений эффективной вязкости при возрастании скорости сдвига, что характеризуют исследуемые образцы как структурированную дисперсную систему. В ходе дополнительных исследований показано, что используемые желатиновые массы обладают тиксотропными свойствами. Образцы желатиновых масс 3–5 имели более узкие петли гистерезиса, при этом у 5 образца самая узкая, восстановление структуры происходит достаточно быстро. Из массы образца 5 получались ленты повышенной прочности, требовалась высокая температура для запайки капсул, в некоторых капсулах шов не склеивался с одной стороны, в результате капсулы получатся жесткими и хрупкими. Капсулы, полученные из желатиновой массы 3 и 4 образцов, имели прочный шов и хорошо вырезались из ленты. В результате проведенного исследования определен реологический оптимум желатиновой массы пригодной для получения капсул ротационно-матричным методом, который имеет границы в диапазонах скоростей сдвига 0,556–243 с⁻¹ и развивающихся при этих скоростях диапазоны вязкости 11,46–5028,76 Па·с и напряжением сдвига 2788–2808 Па.

При изучении миграции действующих веществ через капсулную оболочку установлено, что за три года хранения капсул в закрытой полимерной банке содержание эфирного масла в капсулах «Липовитол» уменьшилось на 4,88 %, в капсулах «Лимонеол» на 5 %, что свидетельствует о частичной миграции масла через желатиновую оболочку. Содержание при этом оставалось в пределах допустимых отклонений (±10 %). Содержание основных компонентов эфирных масел также оставалось в норме допустимых отклонений на протяжении всего срока хранения.

Заключение. Обоснован оптимальный состав оболочки для получения мягких капсул ротационно-матричным методом. Установлено, что реологический оптимум желатиновой массы характеризуется диапазонами вязкости 11,46–5028,76 Па·с и напряжением сдвига 2788–2808 Па. По результатам изучения миграции эфирных масел через оболочку установлен срок хранения мягких желатиновых капсул в стеклянных банках из темного стекла и температуре от 15 до 25 °C – 3 года.

Ключевые слова: желатиновая масса, мягкие капсулы, эфирное масло, реология

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

Вклад авторов. Все авторы в равной степени участвовали в исследовательской работе, обобщении научной литературы, обсуждении и написании текста статьи.

© Молохова Е. И., Пономарева Е. И., Сорокина Ю. В., Алексеева И. В., Рюмина Т. Е., Новикова В. В., Голованенко А. Л., Березина Е. С., Ладутько Ю. М., 2021

© Molokhova E. I., Ponomareva E. I., Sorokina Yu. V., Alekseeva I. V., Ryumina T. E., Novikova V. V., Golovanenko A. L., Berezina E. S., Ladutko Yu. M., 2021

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Молохова Е. И., Пономарева Е. И., Сорокина Ю. В., Алексеева И. В., Рюмина Т. Е., Новикова В. В., Голованенко А. Л., Березина Е. С., Ладутько Ю. М. Экспериментальное обоснование состава желатиновой массы для получения капсул с эфирными маслами. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4-1):63-68. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-63-68](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-63-68)

Experimental Substantiation of the Composition of Gelatin Mass for Obtaining Capsules with Essential Oils

**Elena I. Molokhova¹, Ekaterina I. Ponomareva¹, Yuliya V. Sorokina^{1*}, Irina V. Alekseeva¹,
Tatyana E. Ryumina¹, Valentina V. Novikova¹, Anna L. Golovanenko¹, Elena S. Berezina¹,
Yuliya M. Ladutko²**

¹ Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Yuliya V. Sorokina. E-mail: sorokinayulia@yandex.ru

ORCID: Elena I. Molokhova – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>; Ekaterina I. Ponomareva – <https://orcid.org/0000-0002-3407-3879>;

Yuliya V. Sorokina – <https://orcid.org/0000-0001-9114-7208>; Irina V. Alekseeva – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>;

Tatyana E. Ryumina – <https://orcid.org/0000-0002-7084-5602>; Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>;

Anna L. Golovanenko – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>; Elena S. Berezina – <https://orcid.org/10000-0002-4122-2414>; Yuliya M. Ladutko – <https://orcid.org/0000-0001-5741-4050>.

Received: 20.10.2021 Revised: 29.11.2021 Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Soft gelatin capsules are a promising dosage form comprising essential oils as active agents. Joint research of the staff of the Perm State Pharmaceutical Academy, the Research Institute of Nutrition of the Ministry of Energy and Industry of the Republic of Tajikistan have proposed the composition of gelatin mass for encapsulation by the rotary matrix method. The mechanical and physical-technological parameters required to preserve the strength and elasticity of the capsule shell during the production process and storage are determined.

Aim. Study of the rheological properties of gelatin masses based on gelatin of different grades, as well as the migration of essential oils through capsule shells.

Materials and methods. Pharmaceutical active substances "Lipovitol" and "Limoneol" obtained in the Republic of Tajikistan were used as active substances introduced into the composition of soft gelatin capsules. Sunflower oil was used as the solvent. Gelatin samples were used to obtain gelatin masses: 1 – Foodchem (China), 2 – Brodnickie Zaklady Zelatyny Sp. zo.o. (Poland), 3 - Italgelatine s.p.a. (Italy), 4 – Ewald-Gelatine GmbH (Germany), 5 – Weishardt International (France); glycerol; sunflower oil. Gelatin mass for manufacturing soft capsules was prepared in a closed reactor. Capsules were prepared on an automatic encapsulation line RJWJ – 115 Soft Gelatin Encapsulator Machine (China). The structural and mechanical properties of soft gelatin masses were determined on a rotary viscometer RV type "Reotest 2" (Germany). The dynamics of the process of migration of essential oils and its components were studied by changing their amount in a capsule by chromatographic-mass spectrometry method on a chromatograph Varian CP 3800 with a quadrupole mass spectrometer 4000 MS as a detector (USA).

Results and discussion. When studying the rheological properties of model compositions, it was found that for all samples of gelatin masses there is a decrease in values of effective viscosity when the shear rate increases, which characterizes the tested samples as a structured dispersion system. Additional studies have shown that the gelatin masses have thixotropic properties. Samples of gelatin masses 3-5 had narrower hysteresis loops, while sample 5 the narrowest, restoration of the structure took place quite quickly. Capsules obtained from gelatin mass 3 and 4 samples had a strong seam and were well cut out of the tape. From the mass of sample 5, high strength ribbons were obtained, a high temperature was required to seal the capsules, in some capsules the seam was not glued on one side, as a result, the capsules were rigid and brittle. As a result of the study, the rheological optimum of the gelatin mass suitable for preparing capsules by a rotary matrix method was determined, which has boundaries in the ranges of shear rates of 0.556–243 s⁻¹ and viscosity ranges of 11.46–5028.76 Pa · s and shear stress of 2788–2808 Pa developing at these rates. When studying the migration of active substances through the capsule shell, it was found that over three years of storage of capsules in a closed polymer can, the content of essential oil in Lipovitol capsules decreased by 4.88 %, in Limoneol capsules by 5 %, which indicates partial migration of oil through the gelatin shell. The content remained within the permissible deviations (±10 %). The content of essential oil components also remained within acceptable deviations throughout the shelf life.

Conclusion. The optimal composition of the shell for producing soft capsules by a rotary matrix method is justified. It was found that the rheological optimum of gelatin mass is characterized by viscosity ranges of 11.46–5028.76 Pa · s and shear stress of 2788–2808 Pa. According to the results of the study of the migration of essential oils through the shell, has been established the shelf life of soft gelatin capsules in glass jars made of dark glass and a temperature of 15 to 25 °C – 3 years.

Keywords: gelatin mass, soft capsules, essential oil, rheology

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. All authors equally participated in research work, generalization of scientific literature, discussion and writing of the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Molokhova E. I., Ponomareva E. I., Sorokina Yu. V., Alekseeva I. V., Ryumina T. E., Novikova V. V., Golovanenko A. L., Berezina E. S., Ladutko Yu. M. Experimental substantiation of the composition of gelatin mass for obtaining capsules with essential oils. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):63-68. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-63-68](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-63-68)

ВВЕДЕНИЕ

При разработке лекарственных средств с эфирными маслами большое значение имеет выбор оптимальной лекарственной формы [1–3]. Преимуществами мягких желатиновых капсул с эфирными маслами является их способность сохранять и доставлять липофильные вещества в легкодоступной для организма форме, а также меньшее раздражающее действие масел на слизистую оболочку желудка [4–7].

Совместными исследованиями сотрудников Пермской государственной фармацевтической академии, исследовательского института питания Министерства энергетики и промышленности Республики Таджикистан предложен состав желатиновой массы для капсулирования ротационно-матричным методом. При изучении механических и физико-технологических свойств желатиновой ленты установлено, что для сохранения прочности и эластичности оболочки капсулы во время производственного процесса и хранения модуль Юнга желатиновой ленты должен находиться в интервале 35–50 МПа, удлинение при разрыве – 210–240 %, предел прочности 8–9 МПа [7–9].

При разработке мягких желатиновых капсул особое внимание уделяют изучению реологических свойств желатиновой массы, а также миграции действующих веществ (эфирных масел) через капсулные оболочки, что и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве действующего вещества, вводимого в состав мягких желатиновых капсул, использовали фармацевтическую активную субстанцию «Липовитол», включающую эфирное масло травы герани душистой; а-токоферола ацетат; ретинола ацетат. Для получения мягких желатиновых капсул «Лимонеол» использовали эфирное масло лимона Мейера.

Эфирное масло герани получено паровой дистилляцией свежих или слегка подсушенных надземных частей герани душистой *Pelargoniumgraveolens* L.'Her, семейства Гераниевые; эфирное масло лимона Мейера – прямым прессованием без нагревания в Республике Таджикистан.

В качестве растворителя использовали подсолнечное масло до 0,5 г.

Вспомогательные вещества. Для получения желатиновых масс использовали образцы желатина: 1 – Foodchem (Китай, серия 12061214), 2 – Brodnickie-ZakladYzelatynySp. zo.o. (Польша, серия A-091213), 3 – Italgelatines.p.a. (Италия, серия 010211), 4 – Ewald-Gelatine GmbH (Германия, серия T-0141006), 5 – WeishardtInternational (Франция, серия 081086087); глицерин марка ПК-94 (Акрихимфарм, ГОСТ 6824-96, Россия); масло подсолнечное (ООО «Алтайский подсолнух», ГОСТ 1129-2013).

Методы

Желатиновую массу готовили по следующей технологии: в закрытый реактор, снабженный водяной рубашкой, автоматическим регулятором температур и якорной мешалкой, вносили рассчитанный объем воды очищенной и нагревали до 70–75 °C. В нагретой воде растворяли глицерин. При включенной мешалке в реактор добавляли необходимое количество желатина. Реактор герметично закрывали и после 15 минут перемешивания, смесь нагревалась до 70–75 °C. Желатин расплавлялся, при работающей мешалке, в течение 0,5 часа. После отключения мешалки и обогрева желатиновую массу оставляли в реакторе в течение 1,5–2 часов с подключением вакуума для удаления из массы пузырьков воздуха. Отсутствие пузырьков воздуха и растворение желатина оценивали визуально. Приготовленную желатиновую массу выдерживали при температуре 50–60 °C в течение 2,5–3 часов.

Капсулы получали на автоматической линии для капсулирования RJWJ – 115 SoftGelatinEncapsulatorMachine (Китай).

Структурно-механические свойства мягких желатиновых масс определяли на ротационном вискозиметре «Reotest 2» типа RV (Германия). Анализируемый объект помещали на плиту в количестве 0,1 г. Проводили три измерения с интервалом в 30 мин при температуре 60 °C. Скорость вращения конуса изменили 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.

Динамику процесса миграции эфирных масел и его компонентов изучали по изменению их количества в капсуле хромато-масс-спектрометрическим методом на хроматографе Varian CP 3800 с квадрупольным масс-спектрометром 4000 MS в качестве детектора (США). Использовали кварцевую колонку VF-5ms (5 % фенил, 95 % диметилполисилоксан) длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм. Температура испарителя 280 °C, газ-носитель – гелий – 1 мл/мин. Температура колонки: 50 °C (2 мин), 50–270 °C (со скоростью 4 °C в мин), изотермический режим при 270 °C в течение 10 мин. Пробу масла растворяли в гексане до концентрации 0,5–1 мас.% и полученный раствор вводили в хроматограф в объеме 1 мкл при делении потока 1 : 50. Идентификацию отдельных компонентов производили на основе сравнения времен удерживания, индексов Ковача и полных масс-спектров с соответствующими данными компонентов эталонных масел и чистых соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выбора оптимального состава желатиновой массы для получения мягких капсул проведено исследование реологических характеристик исследу-

емых объектов. В работе исследованы реологические свойства желатиновых масс, имеющих в своем составе желатин разной прочности (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика образцов желатина, используемых в исследовании

Table 1. Characterization of gelatin samples used in the study

Образец № Number of the sample	Фирма производитель Manufacturer	Страна Country	Прочность студня с массовой долей желатина 10 %, Н Jelly strength with mass fraction gelatin 10 %, N
1	Foodchem	Китай China	11,60
2	BrodnickieZaklady Zelatyny Sp. z o.o.	Польша Poland	13,00
3	Italgelatines.p.a.	Италия Italy	14,25
4	Ewald-Gelatine GmbH	Германия Germany	15,50
5	Weishardt International	Франция France	16,80

Реологические параметры модельных композиций измеряли при температуре 60,0 °C. Выбор температурного режима обоснован условиями критической стадии: температурой желатиновой массы при подаче на барабаны для образования ленты, после термостатирования.

По полученным экспериментальным данным рассчитывали значение касательного напряжения сдвига (τ , Па), динамическую вязкость (η , Па · с) и строили реологические кривые.

Экспериментальные данные показали, что при указанной температуре для всех образцов желатиновых масс характерно уменьшение значений эффективной вязкости при возрастании скорости сдвига в прямо пропорциональной зависимости, что характеризуют исследуемые образцы как структурированную дисперсную систему.

Для углубленного реологического исследования образцов желатиновой массы строили кривые кинетики деформации в координатах скорость сдвига от напряжения сдвига в области изменения от малых к большим и от больших к малым, представленные на рисунке 1. Наличие восходящих и нисходящих кривых указывают на то, что исследуемые образцы обладают тиксотропными свойствами.

Ширина петли гистерезиса может служить относительной оценкой степени структурообразовательных процессов в дисперсных системах [10–11]. Чем больше разрастается сетка коагуляционных структур, тем меньше их прочность и разрушение структуры начинает преобладать над восстановлением, такую систему можно охарактеризовать, как тиксолабильную. И, наоборот, чем меньше выражена петля гистерезиса, тем быстрее происходит восстановление сопротивления деформации, а система приближается к структуроустойчивости [12].

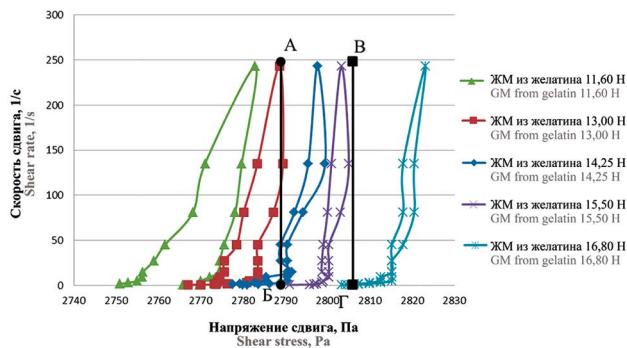


Рисунок 1. Реограммы течения образцов желатиновой массы при температуре 60 °C

Figure 1. Rheograms of the flow of samples of gelatinous mass at a temperature of 60 °C

Как видно из представленных графиков, образец 1 и 2 имеют более широкие петли гистерезиса. При снижении скорости сдвига системы не возвращаются к своему первоначальному состоянию при низкой скорости сдвига, что приближает их к тиксолабильным структурам. В результате производственного процесса из желатиновых масс этих образцов, получались ленты недостаточной прочности, разрывались во время движения между валами, смоченными вазелином и капсулы с низким качеством спайки.

Образцы 3–5 имели более узкие петли гистерезиса, при этом у 5 образца самая узкая. Как видно из графика на рис.1, восстановление структуры у данных образцов происходит быстро. Следовательно, образцы 3–5 можно охарактеризовать как тиксостабильные структуры. Капсулы, полученные из желатиновой массы 3 и 4 образцов, имели прочный шов и хорошо вырезались из ленты. Из массы образца 5 получались ленты повышенной прочности, требовалась высокая температура для запайки капсул, в некоторых капсулах шов не склеивался с одной стороны, в результате капсулы получались жесткими и хрупкими.

В результате проведенного исследования определен реологический оптимум желатиновой массы пригодной для получения капсул ротационно-матричным методом (АБ и ВГ) (рисунок 1), который имеет границы в диапазонах скоростей сдвига 0,556–243 с⁻¹ и развивающихся при этих скоростях диапазоны вязкости 11,46–5028,76 Па · с и напряжением сдвига 2788–2808 Па.

На следующем этапе работы проводили изучение миграции эфирного масла через желатиновую оболочку в процессе хранения капсул.

Основной ингредиент желатиновой массы – желатин, главное свойство которого – возможность образования сетчатый пространственный каркас в водных растворах за счет асимметрией высокополимерных

частиц. В процессе сушки и хранения капсул происходит миграция влаги из каркаса, следовательно, оболочка становится проницаема для легколетучих веществ – эфирных масел [13–14]. Процесс миграции изучали по изменению количества основных компонентов эфирных масел в капсуле, данные представлены в таблице 2.

В ходе исследования установлено, что за три года хранения капсул в закрытой полимерной банке содержание эфирного масла в капсулах «Липовитол» уменьшилось на 4,88 %, в капсулах «Лимонеол» на 5 %, что свидетельствует о частичной миграции масла через желатиновую оболочку. Содержание при этом оставалось в пределах допустимых отклонений ($\pm 10\%$). Содержание основных компонентов эфирных масел также оставалось в норме допустимых отклонений на протяжении всего срока хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании исследований структурно-реологических свойств желатиновой массы обоснован оптимальный состав оболочки для получения мягких капсул ротационно-матричным методом. Установлено, что реологический оптимум желатиновой массы характеризуется диапазонами вязкости 11,46–5028,76 Па · с и напряжением сдвига 2788–2808 Па.

По результатам изучения миграции эфирных масел через оболочку установлен срок хранения мягких желатиновых капсул в стеклянных банках из темного стекла и температуре от 15 до 25 °C – 3 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kwabena D. K., Kwakye O. Dosage forms of herbal medicinal products and their stability considerations—an overview. *Journal of Critical Reviews*. 2017;4(4):1–8. DOI: 10.22159/jcr.2017v4i4.16077.
2. Sachan A. K., Sachan N. K., Kumar S., Sachan A., Gangwar S. S. Evaluation and standardization of essential oils for development of alternative dosage forms. *European Journal of Scientific Research*. 2010;46(2):194–203.
3. da Silva D. J., Gomes M. V., Cabral L. M., de Sousa P. V. Evaluation of the in vitro release and permeation of *Cordia verbenacea* DC essential oil from topical dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;101173. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101173.
4. Демченко Д. В., Пожарская О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. История развития производства капсул. *Фармация*. 2015;8:47–51.
5. Damian F., Harati M., Schwartzenhauer J., Van Cauwenbergh O., Wettig S. D. Challenges of dissolution methods development for soft gelatin capsules. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):214. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020214.
6. Gullapalli R. P. Soft gelatin capsules (Softgels). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(10):4107–4148. DOI: 10.1002/jps.22151.
7. Рождественский Д. А. Клиническая фармакология лекарственных средств на основе эфирных масел. *Медицинские новости*. 2015;10:16–18.
8. Джавахян М. А., Токарева М. Г., Прожогина Ю. Э., Каленикова Е. И. Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):118–127. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127.
9. Романова Е. И., Молохова Е. И., Холов А. К., Мысов М. В. Разработка состава желатиновой массы для получения мягких желатиновых капсул. *Медицинский альманах*. 2014;32(2):135–138.
10. Молохова Е. И., Пономарева Е. И., Адамов А. А., Холов А. К. Механические и физико-технологические свойства желатиновых лент при производстве мягких желатиновых капсул. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(7):46–49.
11. Moss J., Clarke N. A folk theory of the EEC: popular euroscepticism in the early 1980s. *Contemporary British History*. 2021;1–24. DOI: 10.1080/13619462.2021.1918107.

Таблица 2. Динамика процесса миграции эфирного масла и его компонентов через оболочку капсул «Липовитол» и «Лимонеол»

Table 2. Dynamics of the process of migration of essential oil and its components through the capsule shell "Lipovitol" and "Limoneol"

Срок хранения Shelf life	Количество эфирного масла в капсule Липовитол, г The amount of essential oil in a Lipovitol capsule, g	Количество эфирного масла в капсule Лимонеол, г The amount of essential oil in a Limoneol capsule, g	Содержание действующих веществ, г Content of active ingredients, g			
			Липовитол Lipovitol		Лимонеол Limoneol	
			Цитронеллол Citronellol	Гераниол Geraniol	Линалоол Linalool	Лимонен Limonene
0	0,0410 ± 0,0020	0,0400 ± 0,0020	0,0170 ± 0,0003	0,0043 ± 0,0003	0,0015 ± 0,0003	0,0290 ± 0,0003
3 мес 3 months	0,0410 ± 0,0020	0,0400 ± 0,0020	0,0170 ± 0,0004	0,0043 ± 0,0003	0,0015 ± 0,0001	0,0290 ± 0,0003
6 мес 6 months	0,0410 ± 0,0020	0,0400 ± 0,0010	0,0170 ± 0,0003	0,0043 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0002	0,0290 ± 0,0004
1 год 1 year	0,0410 ± 0,0010	0,0400 ± 0,0020	0,0170 ± 0,0002	0,0043 ± 0,0003	0,0015 ± 0,0003	0,0290 ± 0,0002
1 год 6 мес 1 year 6 months	0,0410 ± 0,0020	0,0400 ± 0,0030	0,0170 ± 0,0003	0,0041 ± 0,0003	0,0012 ± 0,0001	0,0286 ± 0,0003
2 года 2 years	0,0410 ± 0,0010	0,0380 ± 0,0010	0,0169 ± 0,0003	0,0041 ± 0,0003	0,0012 ± 0,0002	0,0286 ± 0,0003
2 года 6 мес 2 years 6 months	0,0390 ± 0,0010	0,0380 ± 0,0020	0,0169 ± 0,0004	0,0040 ± 0,0002	0,0012 ± 0,0002	0,0285 ± 0,0003
3 года 3 years	0,0390 ± 0,0020	0,0380 ± 0,0010	0,0169 ± 0,0004	0,0040 ± 0,0003	0,0012 ± 0,0002	0,0285 ± 0,0002

12. Дьячкова Л. В., Трухачева Т. В., Жебентяев А. И. Изучение структурно-механических свойств мазевых основ. Вестник фармации. 2012;3(57):23–28.
13. Stone V., Nowack B., Baun A., van den Brink N., von der Kammer F., Dusinska M., Fernandes T. F. Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment*. 2010;408(7):1745–1754. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.0.
14. Иванова Н. А., Селянинов А. А., Вихарева Е. В., Баранов А. А. Влажность оболочки и прочностные характеристики мягких желатиновых капсул с гидрофильными наполнителями. *Фармация*. 2013;2:36–38.
6. Gullapalli R. P. Soft gelatin capsules (Softgels). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(10):4107–4148. DOI: 10.1002/jps.22151.
7. Rozhdestvensky D. A. Clinical pharmacology of medicines based on essential oils. *Medicinskie novosty*. 2015;10:16–18. (In Russ.)
8. Dzhavakhyan M. A., Tokareva M. G., Prozhogina Yu. E., Kalenikova E. I. Pharmaceutical Development of «Sedoflav» Capsules, Standardization and Validation of Flavonoids Assay Methods. *Razrabotka i registracia lekarstvennyh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):118–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127.
9. Romanova E. I., Molokhova E. I., Kholov A. K., Mysov M. V. Development of the composition of gelatin mass for the production of soft gelatin capsules. *Medicinskii almanac*. 2014;32(2):135–138. (In Russ.)
10. Molokhova E. I., Ponomareva E. I., Adamov A. A., Kholov A. K. Mechanical and physical-technological properties of gelatinous tapes in the production of soft gelatin capsules. *Khimiko-pharmaceuticheskii journal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(7):46–49. (In Russ.)
11. Moss J., Clarke N. A folk theory of the EEC: popular euroscepticism in the early 1980s. *Contemporary British History*. 2021;1–24. DOI: 10.1080/13619462.2021.1918107.
12. Dyachkova L. V., Trukhacheva T. V., Zhebentyaev A. I. Study of structural and mechanical properties of ointment bases. *Vestnik pharmaci. 2012;3(57):23–28. (In Russ.)*
13. Stone V., Nowack B., Baun A., van den Brink N., von der Kammer F., Dusinska M., Fernandes T. F. Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment*. 2010;408(7):1745–1754. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.0.
14. Ivanova N. A., Selyaninov A. A., Vikhareva E. V., Baranov A. A. Shell moisture and strength characteristics of soft gelatin capsules with hydrophilic fillers. *Pharmaciya = Pharmacy*. 2013;2:36–38. (In Russ.)

REFERENCES

1. Kwabena D. K., Kwakye O. Dosage forms of herbal medicinal products and their stability considerations—an overview. *Journal of Critical Reviews*. 2017;4(4):1–8. DOI: 10.22159/jcr.2017v4i4.16077.
2. Sachan A. K., Sachan N. K., Kumar S., Sachan A., Gangwar S. S. Evaluation and standardization of essential oils for development of alternative dosage forms. *European Journal of Scientific Research*. 2010;46(2):194–203.
3. da Silva D. J., Gomes M. V., Cabral L. M., de Sousa P. V. Evaluation of the in vitro release and permeation of *Cordia verbenacea* DC essential oil from topical dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;101173. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101173.
4. Demchenko D. V., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Makarov V. G. History of capsule production development. *Pharmaciya = Pharmacy*. 2015;8:47–51. (In Russ.)
5. Damian F., Harati M., Schwartzenhauer J., Van Cauwenbergh O., Wettig S. D. Challenges of dissolution methods development for soft gelatin capsules. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):214. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020214.
6. Gullapalli R. P. Soft gelatin capsules (Softgels). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(10):4107–4148. DOI: 10.1002/jps.22151.
7. Rozhdestvensky D. A. Clinical pharmacology of medicines based on essential oils. *Medicinskie novosty*. 2015;10:16–18. (In Russ.)
8. Dzhavakhyan M. A., Tokareva M. G., Prozhogina Yu. E., Kalenikova E. I. Pharmaceutical Development of «Sedoflav» Capsules, Standardization and Validation of Flavonoids Assay Methods. *Razrabotka i registracia lekarstvennyh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):118–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127.
9. Romanova E. I., Molokhova E. I., Kholov A. K., Mysov M. V. Development of the composition of gelatin mass for the production of soft gelatin capsules. *Medicinskii almanac*. 2014;32(2):135–138. (In Russ.)
10. Molokhova E. I., Ponomareva E. I., Adamov A. A., Kholov A. K. Mechanical and physical-technological properties of gelatinous tapes in the production of soft gelatin capsules. *Khimiko-pharmaceuticheskii journal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(7):46–49. (In Russ.)
11. Moss J., Clarke N. A folk theory of the EEC: popular euroscepticism in the early 1980s. *Contemporary British History*. 2021;1–24. DOI: 10.1080/13619462.2021.1918107.
12. Dyachkova L. V., Trukhacheva T. V., Zhebentyaev A. I. Study of structural and mechanical properties of ointment bases. *Vestnik pharmaci. 2012;3(57):23–28. (In Russ.)*
13. Stone V., Nowack B., Baun A., van den Brink N., von der Kammer F., Dusinska M., Fernandes T. F. Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment*. 2010;408(7):1745–1754. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.0.
14. Ivanova N. A., Selyaninov A. A., Vikhareva E. V., Baranov A. A. Shell moisture and strength characteristics of soft gelatin capsules with hydrophilic fillers. *Pharmaciya = Pharmacy*. 2013;2:36–38. (In Russ.)



Оригинальная статья / Research article

Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов

У. В. Ногаева^{1*}, Ю. М. Коцур¹, Е. В. Флисюк¹, Д. Ю. Ивкин¹, Е. Д. Семивеличенко¹, И. А. Титович¹, И. А. Наркевич¹, В. Г. Антонов²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, лит. Ж

*Контактное лицо: Ногаева Ульяна Валерьевна. E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: У. В. Ногаева – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Е. Д. Семивеличенко – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>; В. Г. Антонов – <https://orcid.org/0000-0001-9910-5395>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 29.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Остеоартроз (OA) – наиболее распространенное заболевание суставов, которым страдает более 10 % населения земного шара. Каждый год диагноз впервые устанавливается более чем у 600 тысяч человек, однако эти данные не отражают истинной распространенности заболевания, поскольку не все пациенты обращаются за помощью в лечебные учреждения [1, 2].

Цель. Фармацевтическая разработка состава и технологии геля на основе мелоксикама, производного пурина и иммуномодулирующего компонента для терапии OA с фармакологическим обоснованием содержания действующих веществ.

Материалы и методы. Изучена комбинация трех активных фармацевтических субстанций: нестероидного противовоспалительного средства – мелоксикама, производного пурина и оригинального иммуномодулятора М. В качестве гелеобразователей рассматривали альгинат натрия, гидроксиэтилцеллюозу и ксантановую камедь. Были определены два технологических режима получения гелевой основы. Концентрации действующих веществ выбирали, базируясь на результатах доклинических исследований. OA был смоделирован с помощью сочетанного введения в полость скакательного (заплюсневого) сустава 0,1 мл смеси полного адьюванта Фрейнда с 10 % суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:10. Критериями выбора оптимального состава геля служил размер поврежденного сустава, толерантность к физической нагрузке и гистологическая картина в сравнении с интактными и контрольными животными. В отношении количественных данных подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD). Результаты соответствовали законам нормального распределения, статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA), используя программу GraphPad Prism 8.0.2, США при уровне статистической значимости различий $p < 0,05$ и $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение. Разработан состав и предложена технология топической лекарственной формы на основе альгината натрия. Данные доклинических исследований свидетельствуют о том, что наивысшая эффективность достигается при использовании состава, содержащего 3 % производного пурина, 5 % иммуномодулятора М и 0,5 % мелоксикама. Разработанный состав по эффективности подавления симптомов OA показал результаты, превышающие референтный препарат.

Заключение. Разработано оригинальное комбинированное средство для терапии OA. За счет выбранного компонентного состава при большей эффективности удалось снизить дозировку мелоксикама до 0,5 %, а использование в качестве гелеобразователя альгината натрия способствовало пролонгации действия геля и последующему сокращению числа аппликаций.

Ключевые слова: остеоартроз, мелоксикам, доклинические исследования, альгинат, топические лекарственные формы, нестероидные противовоспалительные средства

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

Вклад авторов. Ю. М. Коцур, У. В. Ногаева, И. А. Наркевич и Е. В. Флисюк разработали составы и изготовили топические лекарственные формы. Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко и В. Г. Антонов провели доклинические исследования сравнительной эффективности полученных составов, а также определили концентрации действующих веществ. У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, Ю. М. Коцур, Е. Д. Семивеличенко, И. А. Наркевич, И. А. Титович участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Ногаева У. В., Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Титович И. А., Наркевич И. А., Антонов В. Г. Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):69–78. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-69-78](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78)

© Ногаева У. В., Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Титович И. А., Наркевич И. А., Антонов В. Г., 2021

© Nogaeva U. V., Kotsur Ju. M., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Titovich I. A., Narkevich I. A., Antonov V. G., 2021

Development of the Composition and Technology of a Combined Gel for the Treatment of Osteoarthritis with a Pharmacological Rationale for the Content of Components

Uljana V. Nogaeva^{1*}, Julia M. Kotsur¹, Elena V. Flisyuk¹, Dmitry Yu. Ivkin¹,
Evgeniy D. Semivelichenko¹, Irina A. Titovich¹, Igor A. Narkevich¹, Victor G. Antonov²

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² S. M. Kirov Military Medical Academy, 62Zh, Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russia

*Corresponding author: Uljana V. Nogaeva. E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: Uljana V. Nogaeva – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; Julia M. Kotsur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Evgeniy D. Semivelichenko – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>;

Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>; Victor G. Antonov – <https://orcid.org/0000-0001-9910-5395>.

Received: 20.10.2021

Revised: 29.11.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease that affects more than 10 % of the world's population. More than 600 000 people are diagnosed for the first time each year, but these data do not reflect the true prevalence of the disease, since not all patients seek help from hospitals [1, 2].

Aim. Pharmaceutical development of the composition and technology of a gel based on meloxicam, a purine derivative and an immunomodulating component for the treatment of OA with pharmacological substantiation of the content of active substances.

Materials and methods. A combination of three active pharmaceutical substances was studied: a non-steroidal anti-inflammatory drug – meloxicam, a purine derivative and an original immunomodulator M. Sodium alginate, natriozole and xanthan gum were considered as gelling agents. Were identified two technological modes of obtaining a gel base. The concentrations of active substances were selected based on the results of preclinical studies. OA was modeled by the combined administration of 0.1 ml of a mixture of Freund's complete adjuvant with a 10 % talc suspension in isotonic sodium chloride solution in a ratio of 1:10 into the hock (tarsus) joint cavity. The criteria for choosing the optimal composition of the gel were the size of the damaged joint, exercise tolerance and the histological picture in comparison with intact and control animals. For quantitative data, sample mean values (M) and standard deviations (SD) were calculated. The results corresponded to the laws of normal distribution, statistical processing was carried out using one-way analysis of variance (One-Way ANOVA) using the GraphPad Prism 8.0.2 software, USA at the level of statistical significance of differences $p < 0,05$ и $p < 0,001$.

Results and discussion. The composition was developed and the technology of the topical dosage form based on sodium alginate was proposed. Preclinical data indicate that the highest efficacy is achieved when using a formulation containing 3 % purine derivative, 5 % immunomodulator M and 0.5 % meloxicam. The developed composition for the effectiveness of suppressing the symptoms of OA showed results that exceeded the reference drug.

Conclusion. An original combined agent for the treatment of OA has been developed. Due to the selected component composition, with greater efficiency, it was possible to reduce the dosage of meloxicam to 0.5 %, and the use of sodium alginate as a gelling agent contributed to the prolongation of the action of the gel and the subsequent reduction in the number of applications.

Keywords: osteoarthritis, meloxicam, preclinical studies, alginate, topical dosage forms, nonsteroidal anti-inflammatory drugs

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. Julia M. Kotsur, Uljana V. Nogaeva, Igor A. Narkevich and Elena V. Flisyuk developed formulations and manufactured topical dosage forms. Dmitry Yu. Ivkin, Evgeniy D. Semivelichenko and Victor G. Antonov conducted preclinical studies of the comparative effectiveness of the obtained formulations, and also determined the concentrations of active substances. Uljana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Julia M. Kotsur, Evgeniy D. Semivelichenko, Igor A. Narkevich, Irina A. Titovich participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Nogaeva U. V., Kotsur Ju. M., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Titovich I. A., Narkevich I. A., Antonov V. G. Development of the composition and technology of a combined gel for the treatment of osteoarthritis with a pharmacological rationale for the content of components. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):69–78. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-69-78](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78)

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к проблеме лечения остеоартроза (OA) связан с широкой распространностью и прогрессирующим характером течения этого заболевания, приводящего к снижению или потере трудоспособности, ранней инвалидизации работающего населения и выраженному снижению качества жизни [3, 4].

В Российской Федерации, по данным официальной статистики, в 2010 году было зарегистрировано 3 млн 700 тыс. пациентов [5]. Каждый год диагноз впервые устанавливается более чем у 600 тысяч человек, однако эти данные не отражают истинной распространенности заболевания, поскольку не все пациенты обращаются за помощью в лечебные учреждения [1].

Современный подход к терапии остеоартроза предполагает использование немедикаментозных и медикаментозных методов [6, 7]. Особый интерес представляет использование нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). При топическом применении некоторые из них (например, кетопрофен и мелоксикам) оказывают позитивное влияние на проявления ОА [8, 9], что определяется их противовоспалительным и отчетливым анальгетическим действием, влиянием на интерлейкины и металло-протеиназы, способствующие разрушению хряща [10]. НПВП способны не только уменьшать выраженность боли в суставах, но и подавлять экссудативные явления и восстанавливать объем движений в пораженных суставах, то есть воздействовать на основные субъективные и объективные симптомы ОА [11].

Многие пациенты вынуждены принимать НПВП практически постоянно. В связи с этим актуальна разработка комбинированного противовоспалительного средства, обладающего пролонгированным действием при топическом применении (комплаентность и отсутствие необходимости учёта коморбидности).

Результаты клинических исследований свидетельствуют об эффективности и хорошей переносимости мелоксикама [12–14]. Отдельно отмечается его положительное влияние на метаболизм гиалинового хряща – основного плацдарма развития патологического процесса при остеоартрозе [15].

Введение в состав геля дополнительных противовоспалительных и иммуномодулирующих компонентов может способствовать возникновению синергического эффекта, а также уменьшению дозировки собственно мелоксикама.

Целью настоящего исследования стала фармацевтическая разработка состава и технологии противовоспалительного средства для терапии ОА с фармакологическим обоснованием содержания компонентов.

Во время работы решались следующие задачи:

1. Разработка состава гелевой основы.
2. Изучение свойств действующих веществ и их совместимости между собой и с компонентами гелевой основы.
3. Разработка технологии получения геля для наружного применения и наработка лабораторных серий геля для проведения фармакологических исследований.
4. Проведение доклинических исследований, позволяющих определить оптимальные дозировки заявленных компонентов, а также оценить эффективность и безопасность полученного средства.

Методология проведения НИР основана на научно-обоснованных технологиях и методах, системном анализе информационных источников, составлении плана НИР и выполнении отдельных экспериментальных работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы в качестве АФС было взято три вещества, обладающих разными свойствами:

1. Мелоксикам – НПВП, механизм действия которого связан с ингибированием синтеза простагландинов в результате избирательного подавления ферментативной активности циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), участвующей в биосинтезе простагландинов в области воспаления. Мелоксикам оказывает хондропозитивное действие на суставной хрящ. По своим физико-химическим свойствам он представляет собой светло-жёлтое вещество, практически нерастворимое в воде.
2. Производное пурина – белый кристаллический порошок, который в ходе доклинических исследований уже показал свою противовоспалительную активность за счет влияния на обменные процессы.
3. Иммуномодулятор М – белый крупнокристаллический порошок, легко растворимый в воде.

При разработке мягкой лекарственной формы в качестве потенциальных гелеобразователей использовали: альгинат натрия (Protanal PH 1033, Ирландия), гидроксигилцеллюлозу (Natrosol 250, Ashland, США) и ксантановую камедь (Foodchem®, Китай).

Критериями выбора при подборе оптимального гелеобразователя являлись органолептические свойства: внешний вид, цвет, запах, текучесть, распределаемость получаемого геля.

Для каждого гелеобразователя готовили водные растворы трех концентраций: 0,5, 1,0 и 2,0 %. Параллельно определяли оптимальный режим получения раствора гелеобразователя.

Исследовали два режима растворения:

I режим – к навеске гелеобразователя приливали 40 мл холодной воды и оставляли набухать в течение 20 часов. После набухания тщательно перемешивали в ламинарном режиме (без образования пузырей).

II режим – отмеривали 40 мл горячей воды в мерный стакан (60–70 °C) и устанавливали на мешалку. Включали мешалку со скоростью 300 оборотов в минуту, навеску гелеобразователя вносили при перемешивании в образующуюся воронку порциями, таким образом, чтобы не образовывалось комков. При необходимости оставляли набухать в течение 60 мин.

В качестве вспомогательных веществ рассматривали твин-80 (Tween® 80, Merck, Германия), диметильтульфоксид – ДМСО (АО «Экос-1», Россия), пропиленгликоль (АО «Экос-1», Россия), кремофор (Kolliphor® RH 40, Merck, Германия).

Для отвешивания АФС и реактивов использовали весы OHAUS PA-214, США, размер частиц после растворения мелоксикама оценивали с помощью цифрового микроскопа 40x – 1600x (Bresser® LCD MICRO 5MP, Германия). Для приготовления гелевых составов использовали мешалку с верхним приводом Heidolph RZR 2000, Германия, при оценке кислотности – pH-метр Аквилон-410, Россия.

Для оценки эффективности разработанных составов и выбора оптимальной концентрации каждого компонента проводились трехэтапные доклинические исследования. Фармакологическую эффективность итогового состава сравнивали с эффектом от применения референс-препарата, содержащего мелоксикам (Амелотекс®, гель для наружного применения 1 % 50,0, ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия, серия 140520, срок годности до 05.23).

В качестве тест-системы были выбраны лабораторные аутбредные крысы самцы по 8 животных в каждой группе. Количество животных, используемых в исследовании, достаточно для получения статистически достоверных результатов и при этом было минимальным возможным по биоэтическим принципам.

ОА был смоделирован с помощью сочетанного введения в полость скакательного (заплюсневого) сустава 0,1 мл смеси полного адьюванта Фрейнда с 10 % суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:10.

Критериями выбора оптимального состава геля служил размер повреждённого сустава, толерантность к физической нагрузке и гистологическая картина в сравнении с интактными и контрольными животными.

Гели и основа по 0,1 мл наносились животным ежедневно 1 раз в день накожно. Для предотвращения слизывания животными нанесенных на кожу испытуемых препаратов, образцы наносились путем втирания до полного впитывания. На протяжении эксперимента еженедельно проводился клинический осмотр. На 28 день после начала каждого этапа проводилась оценка толерантности к физической нагрузке, а на 29-й день – эвтаназия углекислым газом в CO₂-боксе модели THF3481-V01 (производитель BIOSCAPE (EHRET), Германия) с выделением пораженного сустава для передачи в гистологическую лабораторию.

Физическую выносливость изучали путем однократного помещения животных на тредмил (Treadmill System for rats, TSE, Германия). Скорость движения транспортерной ленты – 0,7 м/сек, угол наклона – 15°. Критерием полного утомления животного служило отсутствие реакции крысы на удар током 3 мА. Регистрировали время окончания бега в секундах, затем животное удаляли с транспортера.

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD).

Результаты соответствовали законам нормального распределения, статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA), используя программу GraphPad Prism 8.0.2, США при уровне статистической значимости различий $p < 0,05$ и $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной тенденцией развития фармацевтики является создание лекарственных препаратов с минимальным системным влиянием и локальным действием на поражённые органы и ткани.

Выбор основы лекарственных форм для наружного применения зависит от многих факторов, начиная со стабильности и совместимости, типа болезни и кожи, на которую препарат будет наноситься, и, заканчивая биофармацевтическими аспектами.

Исследование свойств выбранных нами гелеобразователей показало, что оптимальным для нашей фармацевтической разработки будет использование альгината натрия в 2 % концентрации. Полученный гель обладал приятной консистенцией, упругостью, легко распределялся и не растекался. Для его получения оказались приемлемы оба технологических режима, при перемешивании не образовывались пузыри. Гель получался прозрачным, со слабым характерным запахом и кислотностью, равной 6,5 [16, 17].

В рамках подбора оптимального компонентного состава геля было изучено 9 составов с различной концентраций гелеобразователя, ПАВ и пропиленгликоля. Установлено, что гели, содержащие кремофор, обладали большей упругостью и меньше растекались при нанесении на кожу.

Для определения оптимального способа введения действующих веществ в основу, согласно методике, предложенной Государственной Фармакопеей 14 издания, было проведено изучение растворимости компонентов.

Оказалось, что производное пурина и иммуномодулятор М гидрофильтры, следовательно, их можно вводить либо в виде растворов в гелевую основу, либо растворять в готовой основе.

Мелоксикам плохо растворим в используемых вспомогательных веществах, однако он образует истинный раствор в диметилсульфоксиде (ДМСО), использование которого в составе данного геля ограничена химической несовместимостью с иммуномодулятором М.

Поскольку размер частиц мелоксикама в пропиленгликоле при просмотре под цифровым микроскопом оказался меньше 100 мкм, было принято решение вводить мелоксикам в виде тонкой суспензии.

В результате, была разработана следующая технология получения геля:

1. Компоненты смеси отвешивали в соответствии с составом.
2. В термостойком стакане нагревали воду очищенную (примерно 2/3 от рассчитанного количества) до температуры (50–60) °C.
3. Емкость с нагретой водой очищенной устанавливали на мешалку с верхним приводом на скорости вращения 300 об/мин. При перемешивании вносили в воду расчетное количество альгината натрия. Перемешивали до полного набухания и растворения гелеобразователя.

4. К полученному раствору гелеобразователя добавляли кремофор RH 40 и твин 80.
5. В отдельной емкости готовили суспензию мелоксикама в пропиленгликоле, которую вносили в емкость с раствором гелеобразователя.
6. В сухую чистую ступку помещали рассчитанное количество производного пурина и иммуномодулятора М, компоненты растирали пестиком.
7. Вносили раствор гелеобразователя и мелоксикама в ступку небольшими порциями при постоянном перемешивании. Добавляли оставшееся количество воды очищенной и снова перемешивали до однородности.
8. Полученный гель помещали в банку с навинчивающейся крышкой и в дальнейшем использовали для фармакологических исследований.

На рисунке 1 представлена технологическая схема получения противовоспалительного геля на основе альгината натрия в лабораторных условиях.

Важной составляющей представляющей фармацевтической разработки стало определение оптимального количества каждого действующего вещества. На первом этапе доклинических исследований выбирали концентрацию производного пурина, на втором – иммуномодулятора М и на третьем – мелоксикама (рисунок 2).

Было определено, что наивысшую активность производное пурина демонстрирует при 3 % концентрации, а иммуномодулятор М – при 5 % содержании.

Сравнительная эффективность применения гелей, отличающихся только содержанием мелоксикама, представлена далее.

1. Оценка размеров поврежденного сустава.

Для оценки противовоспалительной эффективности гелей были измерены размеры поврежденного скакательного сустава крыс в сравнении с животными контрольной группы и неповрежденным суставом второй задней конечности [18]. Измерение проводилось с помощью электронного штангенциркуля (погрешность измерений, $\pm 0,03$ мм), с фиксацией на

скакательном суставе. Результаты представлены в таблице 1.

По влиянию на изменение размера сустава разработанные составы оказались сопоставимыми между собой и референтным препаратом.

2. Толерантность к физической нагрузке.

С учетом избегания использования поврежденного сустава/одной из опорных конечностей был проведен тест толерантности к физической нагрузке, данные представлены в виде диаграммы, где концентрации даны по мелоксикаму (рисунок 3).

По оси ординат показана длина дистанции, которую преодолевало животное. Наибольшую активность по влиянию на двигательную активность продемонстрировали гели, содержащие мелоксикам в концентрации 0,5 % и 1 %.

3. Гистологическое исследование.

Адьювант-индуцированный артрит является одной из старейших экспериментальных моделей, которая используется для тестирования лекарственных препаратов из группы НПВП [19]. Особенности модели заключаются в наличии отека конечностей, деградации хрящей, лимфоцитарной инфильтрации воспаленной ткани суставов, утрате их функции, кроме того, отмечается резорбция кости и надкостницы; однако повреждение хряща происходит в меньшей степени, чем в аналогичной патологии у человека. Введение же талька в сустав способствует истиранию поверхностей.

На рисунке 4 представлены патологические изменения, которые наблюдались при моделировании патологии.

В зависимости от наносимого геля патологическая картина воспалительного процесса в группах отличалась.

Большая оценка патологического процесса представлена в таблице 2. Большую противовоспалительную активность показал гель с 0,5 % содержанием мелоксикама.

Табл. 1. Сравнительная эффективность гелей по влиянию на размер скакательных суставов крыс-самцов в зависимости концентрации мелоксикама ($M \pm SD$)

Tab. 1. Comparative efficacy of gels for the effect on the size of the hock joints of male rats depending on the concentration of meloxicam ($M \pm SD$)

Гель/Показатель Gel/indicator	Толщина лапы, мм Paw thickness, mm							
	1*	2*	Δ*	ИР*, % IR*, %	1**	2**	Δ**	ИР**, % IR**, %
0,25 %	$4,54 \pm 0,11$	$5,60 \pm 0,15$	$1,06 \pm 0,22$	$23,33 \pm 5,16$	$4,54 \pm 0,11$	$7,50 \pm 0,23$	$2,95 \pm 0,29$	$65,17 \pm 7,50$
0,5 %	$4,55 \pm 0,17$	$5,61 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,20$	$23,64 \pm 4,88$	$4,55 \pm 0,17$	$7,31 \pm 0,39$	$2,76 \pm 0,43$	$59,98 \pm 10,75$
1 %	$4,55 \pm 0,14$	$5,59 \pm 0,22$	$1,05 \pm 0,29$	$23,17 \pm 6,86$	$4,55 \pm 0,14$	$7,18 \pm 0,50$	$2,64 \pm 0,50$	$55,84 \pm 12,81$
Амелотекс®, 1 % Amelotex®, 1 %	$4,59 \pm 0,14$	$5,57 \pm 0,20$	$0,98 \pm 0,27$	$21,43 \pm 6,48$	$4,59 \pm 0,14$	$7,44 \pm 0,36$	$2,84 \pm 0,38$	$62,01 \pm 8,99$
Основа Base	$4,59 \pm 0,12$	$5,57 \pm 0,21$	$0,98 \pm 0,20$	$21,44 \pm 4,52$	$4,59 \pm 0,12$	$7,52 \pm 0,59$	$2,93 \pm 0,64$	$63,93 \pm 14,78$

Примечания. 1 – правая лапа (контроль); 2 – левая лапа (опыт); * показатели через 1 день; ** показатели через 4 недели.

Notes. 1 – right paw (control); 2 – left paw (experience); * indicators after 1 day; ** indicators after 4 weeks.

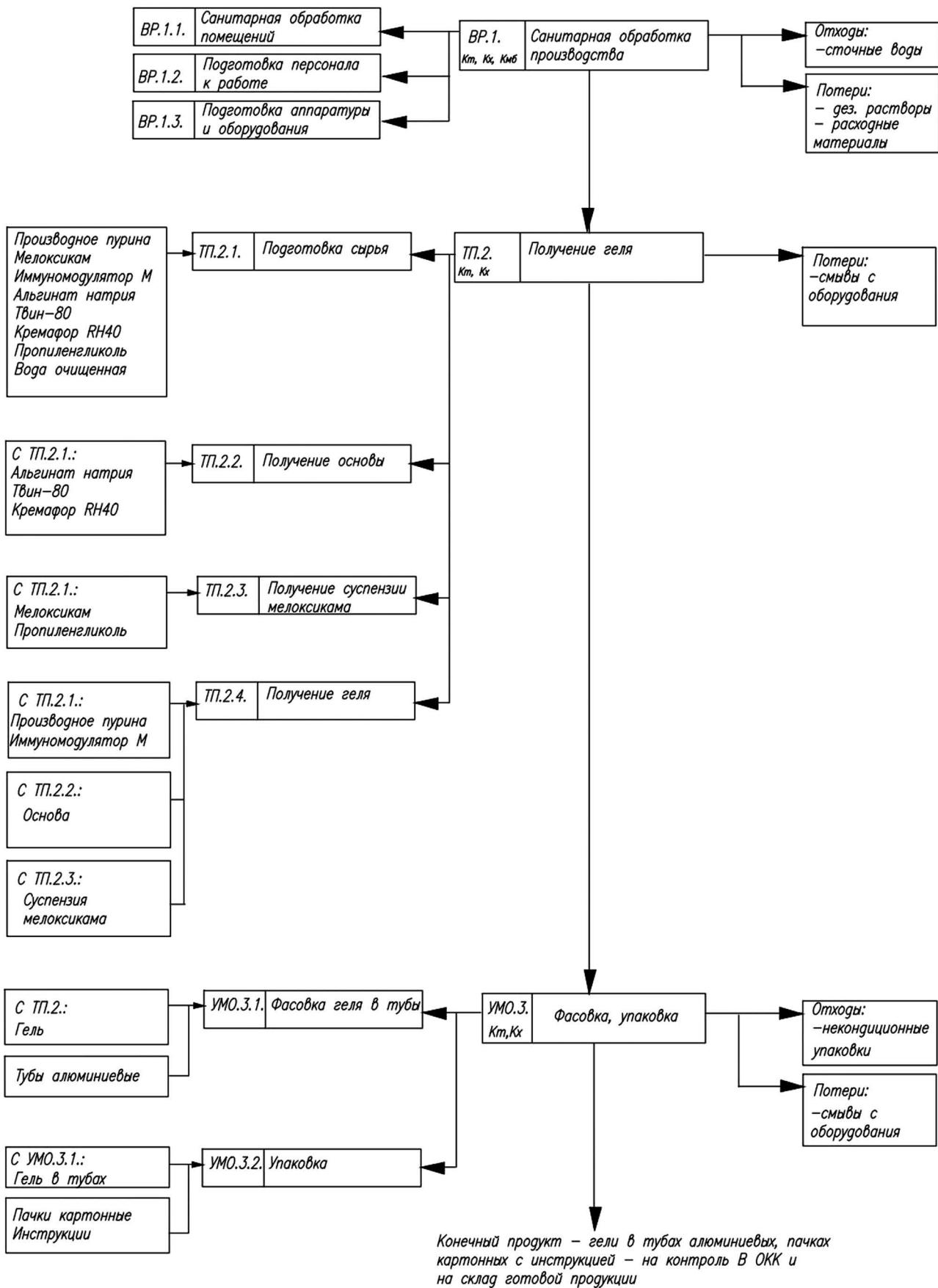


Рисунок 1. Технологическая схема получения противовоспалительного геля на основе альгината натрия

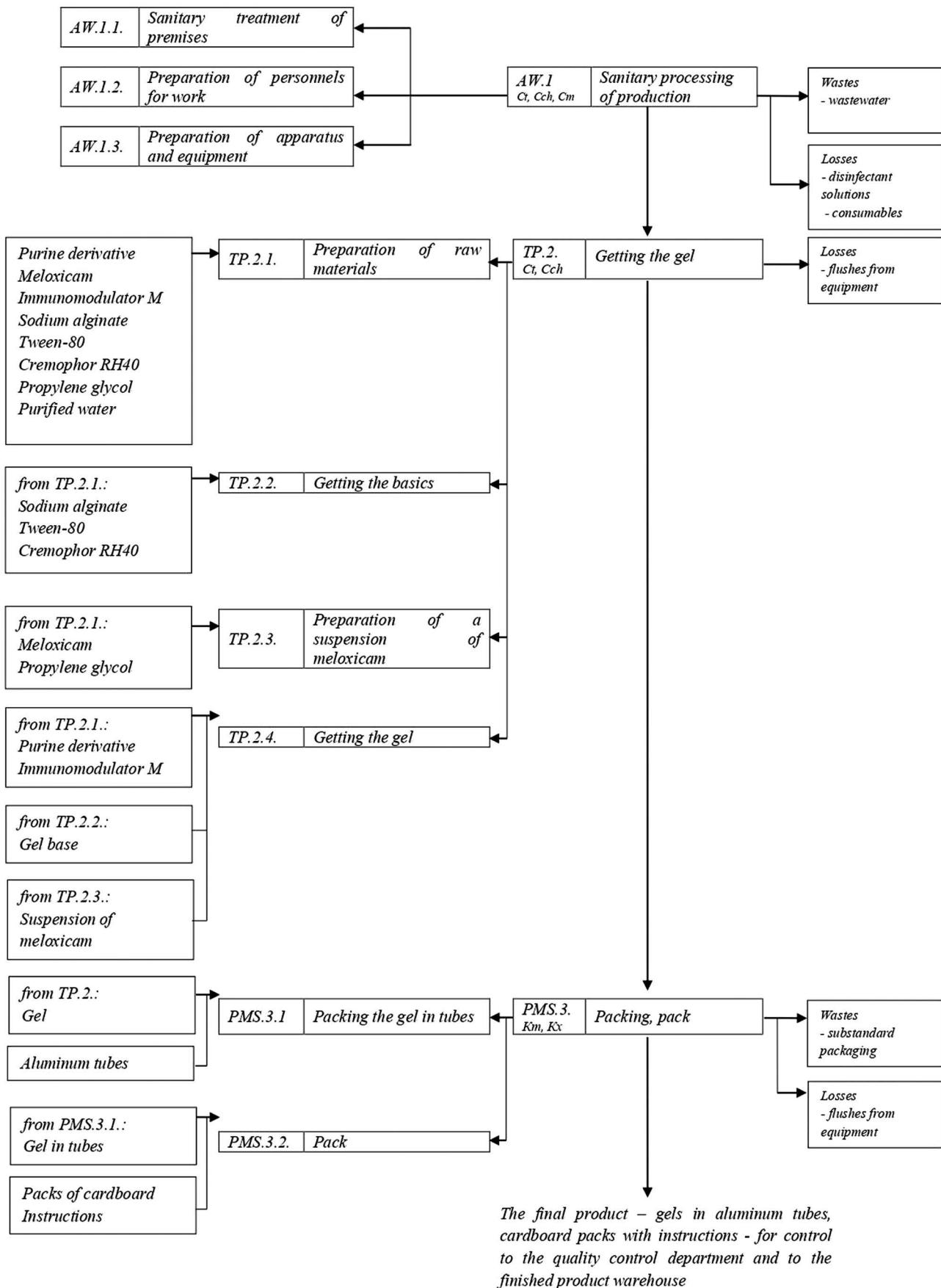


Figure 1. Technological scheme for obtaining an anti-inflammatory gel based on sodium alginate

Фармакологическое обоснование содержания компонентов

(схема доклинических исследований)

Pharmacological substantiation of the content of components
(scheme of preclinical studies)

1. Выбор % производного пурина

1. Selection of the purine derivative concentration

3%

5%

7%

* при содержании иммуномодулятора М и мелоксикама 1%

* at a concentration of immunomodulator M and meloxicam 1%

2. Выбор % иммуномодулятора М

2. Selection of immunomodulator M concentration

3%

5%

** при содержании мелоксикама 1%

** at a concentration of meloxicam 1%

3. Выбор % мелоксикама

3. Selection of meloxicam concentration

1%

0,5%

0,25%

референс-препарат
reference drug

данные со 2-го этапа
second stage data

Рисунок 2. Схема фармакологического обоснования содержания компонентов

Figure 2. Scheme of pharmacological substantiation of the content of components

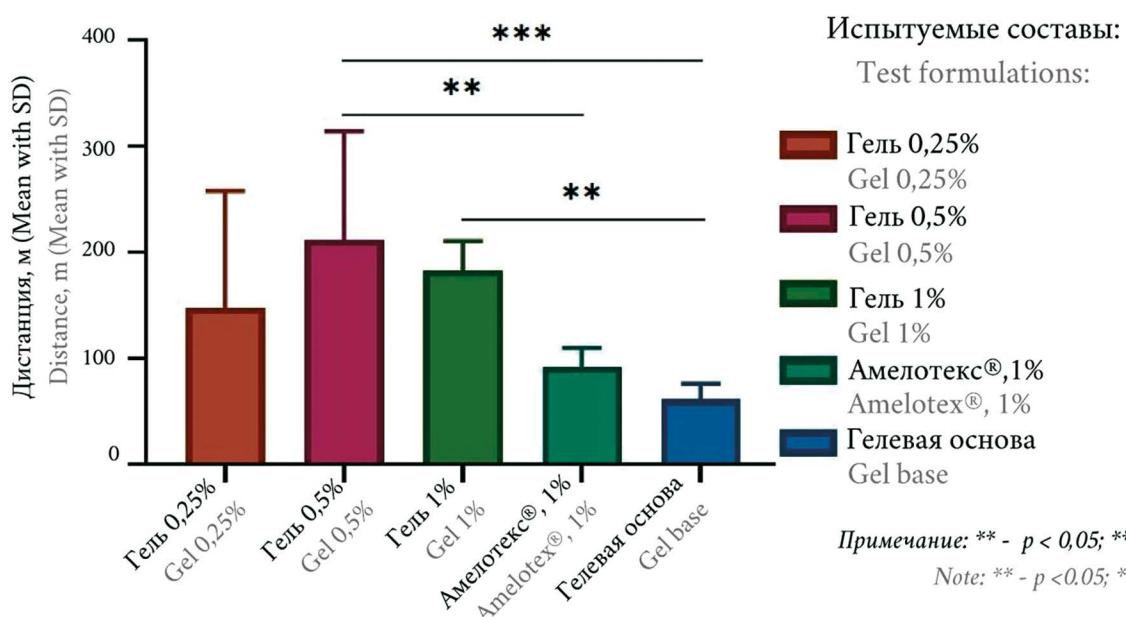


Рисунок 3. Сравнительная оценка двигательной активности животных, получавших гель с разной концентрацией мелоксикама, референтный препарат Амелотекс® и гелевую основу

Figure 3. Comparative assessment of the motor activity of animals receiving gel with different concentrations of meloxicam, the reference drug Amelotex® and the gel base

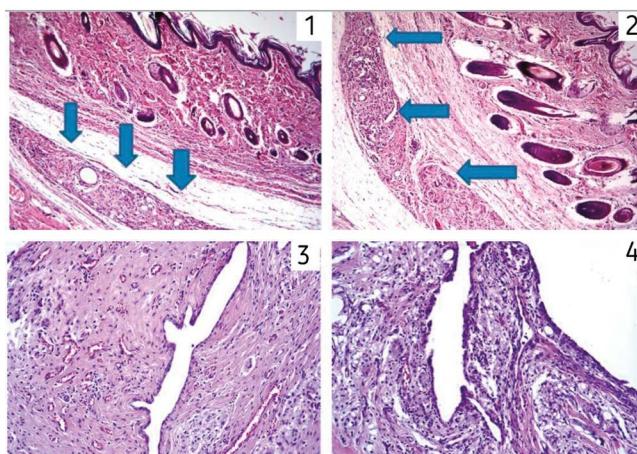


Рисунок 4. Выявленные патологические изменения гистологической картины:

1. Очаговое распространение воспалительной инфильтрации на окружающие мягкие ткани вплоть до подкожной жировой клетчатки (ув. x100); 2. Очаговое распространение воспалительной инфильтрации на окружающие мягкие ткани вплоть до дермы (ув. x100); 3. Очаговый умеренно выраженный фиброз в стенке суставной сумки (ув. x200); 4. Очаговые разрастания фиброзной и зрелой грануляционной ткани в суставной сумке с умеренно выраженной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией с умеренно выраженной гигантоклеточной реакцией (ув. x200)

Figure 4. Revealed pathological changes in the histological picture:

1. Focal spread of inflammatory infiltration to the surrounding soft tissues up to the subcutaneous fatty tissue (magnification x100); 2. Focal spread of inflammatory infiltration to the surrounding soft tissues up to the dermis (magnification x100); 3. Focal moderately pronounced fibrosis in the wall of the articular bag (magnification x200); 4. Focal growths of fibrous and mature granulation tissue in the articular capsule with moderately pronounced lympho-histiocytic infiltration with moderately pronounced giant cell reaction (magnification x200)

По совокупности результатов проведенных исследований для дальнейшей разработки рекомендован гель, содержащий 3 % производного пурина, 5 % иммуномодулятора М и 0,5 % мелоксикама.

Уменьшение дозировки мелоксикама с 1,0 до 0,5 % при одновременном сохранении эффективности позволит минимизировать риск нежелательных лекарственных реакций при использовании разработанного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день остеоартроз продолжает оставаться сложной медико-социальной проблемой. Проведенное исследование посвящено разработке состава комбинированного противовоспалительного средства. В результате был подобран тип гелеобразователя и его концентрация, определены вспомогательные вещества, изучены свойства действующих веществ, в том числе их растворимость в компонентах основы. Предложена технологическая схема получения топического средства на основе альгината натрия.

В ходе доклинических исследований по совокупности оцениваемых параметров определен наиболее эффективный количественный состав каждой АФС: 3 % adenозина, 5 % иммуномодулятора М и 0,5 % мелоксикама, превосходящий референтный препарат на основе 1 % мелоксикама.

Таблица 2. Балльная гистологическая оценка выраженности патологического процесса в суставе

Table 2. Scoring histological assessment of the severity of the pathological process in the joint

Группа Group	Выраженность альтеративной фазы воспаления (некроза) The severity of the alternative phase of inflammation (necrosis)	Выраженность экссудативной фазы воспаления (воспалительной инфильтрации) The severity of the exudative phase of inflammation (inflammatory infiltration)	Выраженность гигантоклеточной реакции The severity of the giant cell response	Выраженность продуктивной фазы воспаления (организации) The severity of the productive phase of inflammation (organization)	Сумма баллов Points total
Гель 0,25% Gel 0,25%	0	8	6	5	19
Гель 0,5% Gel 0,5%	0	4	3	6	13
Гель 1% Gel 1%	0	10	9	11	30
Амелотекс®, 1 % Amelotex®, 1 %	0	6	4	8	18
Гелевая основа Gel base	0	11	17	12	40

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Л. И., Таскина Е. А., Кашеварова Н. Г. Остеоартрит: эпидемиология, классификация, факторы риска и прогрессирования, клиника, диагностика, лечение. *Современная ревматология*. 2019;13(2):9–21. DOI: 10.14412/1996-7012-2019-2-9-21.
- Наумов А. В., Ховасова Н. О., Мороз В. И., Ткачева О. Н. Остеоартрит и гериатрические синдромы. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2019;119(9–2):90–98. DOI: 10.17116/jneuro201911909290.
- Лисицына Е. М., Лисицын М. П., Заремук А. М. Современный подход к патогенезу, диагностике и лечению остеоартроза коленного сустава. *Эндоскопическая хирургия*. 2016;22(6):57–67. DOI: 10.17116/endoskop201622657-67.
- Шавловская О. А. Эффективность локальной терапии НПВП при остеоартрозе различной локализации. *Медицинский совет*. 2017;11:18–22. DOI: 10.21518/2079-701X-2017-18-22.
- Балабанова Р. М., Эрдес Ш. Ф. Динамика распространенности ревматических заболеваний, входящих в XIII класс МКБ-10, в популяции взрослого населения Российской Федерации за 2000–2010 гг. *Научно-практическая ревматология*. 2012;50(3):10–12. DOI: 10.14412/1995-4484-2012-702.
- Вакуленко О. Ю., Жиляев Е. В. Остеоартроз: современные подходы к лечению. *РМЖ*. 2016;22:1494–1498.
- Ивкин Д. Ю., Ивкина А. С. Симптоматические препараты замедленного действия в терапии остеоартроза. *Лечящий врач*. 2012;7:100–104.

8. Беляцкая А. В., Краснюк (Мл.) И. И., Краснюк И. И., Мачикина Т. Е., Коростелева Ю. А., Степанова О. И., Кашликова И. М., Сковпень Ю. В., Воробьёв А. Н. Кетопрофен: применение и лекарственные формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):102–107.
9. Bindu S., Mazumder S., Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. *Biochemical Pharmacology*. 2020;180:114–147. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147.
10. Цветкова Е. С., Иониченок Н. Г., Денисов Л. Н. Современная фармакотерапия остеоартроза коленных суставов: особенности симптоматического и болезнь-модифицирующего действия. Сообщение 1. Особенности симптоматического действия современных препаратов при остеоартрозе коленных суставов. Научно-практическая ревматология. 2015;53(1):63–68. DOI: 10.14412/1995-4484-2015-63-68.
11. Rodriguez-Merchan E. C. Topical therapies for knee osteoarthritis. *Postgraduate Medicine*. 2018;130(7):607–612. DOI: 10.1080/00325481.2018.1505182.
12. Яковлев Е. В., Леонтьев О. В., Живолупов С. А., Гневышев Е. Н., Смирнов А. А., Живолупова Ю. А., Самарцев И. Н. Сравнительная характеристика клинической эффективности оригинального препарата Мовалис и Амелотекса в лечении неспецифической поясничной боли. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2020;120(7):56–62. DOI: 10.17116/jneuro202012007156.
13. Khalil N. Y., Aldosari K. F. Meloxicam. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2020;(45):159–197. DOI: 10.1016/bs.podrm.2019.10.006.
14. Zhang Z. J., Osmałek T., Michniak-Kohn B. Deformable Liposomal Hydrogel for Dermal and Transdermal Delivery of Meloxicam. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;24(15):9319–9335. DOI: 10.2147/IJN.S274954.
15. Li J.-Y., Wang S., Dong Y. The effect of topical application of meloxicam on inflamed dental pulp. *Journal of Dental Sciences*. 2021;16(3):915–921. DOI: 10.1016/j.jds.2020.11.010.
16. Rastogi P., Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication*. 2019;11(4):042001. DOI: 10.1088/1758-5090/ab331e.
17. Kothale D., Verma U., Dewangan N., Jana P., Jain A., Jain D. Alginate as promising natural polymer for pharmaceutical, food, and biomedical applications. *Current Drug Delivery*. 2020;17(9):755–775. DOI: 10.2174/1567201817666200810110226.-
18. Голованенко А. Л., Рудакова И. П., Алексеева И. В., Березина Е. С., Новикова В. В. Исследование противовоспалительной активности новых лекарственных форм для лечения кариеса дентина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(2):140–142.
19. Касич И. Н., Ермакова Л. А., Яшинский Л. Б. Экспериментальные модели аутоиммунных патологических процессов при использовании Адьюванта Фрейнда. *Молодой ученый*. 2016;29(2):18–22.
5. Balabanova R. M., Jerdes Sh. F. The dynamics of the prevalence of rheumatic diseases included in the XIII class of ICD-10 in the adult population of the Russian Federation in 2000–2010. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2012;50(3):10–12. (In Russ.) DOI: 10.14412/1995-4484-2012-702.
6. Vakulenko O. Yu., Zhilyaev E. V. Modern treatment approaches to osteoarthritis. *RMJ*. 2016;22:1494–1498. (In Russ.)
7. Ivkin D. Yu., Ivkina A. S. Symptoms of delayed action in the therapy of osteoarthritis. *Lechashchii vrach*. 2012;7:100–104. (In Russ.)
8. Belyatskaya A. V., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Machikina T. E., Korosteleva Yu. A., Stepanova O. I., Kashlikova I. M., Skovpen Yu. V., Vorob'ev A. N. Ketoprofen: application and dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;(2):102–107. (In Russ.)
9. Bindu S., Mazumder S., Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. *Biochemical Pharmacology*. 2020;180:114–147. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147.
10. Cvetkova E. S., Ionichenok N. G., Denisov L. N. Modern pharmacotherapy of osteoarthritis of the knee joints: features of symptomatic and disease-modifying action. Message 1. Features of the symptomatic action of modern drugs in osteoarthritis of the knee joints. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2015;53(1):63–68. (In Russ.) DOI: 10.14412/1995-4484-2015-63-68.
11. Rodriguez-Merchan E. C. Topical therapies for knee osteoarthritis. *Postgraduate Medicine*. 2018;130(7):607–612. DOI: 10.1080/00325481.2018.1505182.
12. Yakovlev E. V., Leontiev O. V., Zhivolupov S. A., Gnevyshev E. N., Smirnov A. A., Zhivolupova Y. A., Samartcev I. N. Comparative characteristic of clinical efficacy of the original drug movalis and its generic amelotex in the treatment of non-specific lumbar pain. *Zhurnal Nevrologii i Psichiatrii imeni S. S. Korsakova = S. S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2020;120(7):56–62. DOI: 10.17116/jneuro202012007156.
13. Khalil N. Y., Aldosari K. F. Meloxicam. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2020;(45):159–197. DOI: 10.1016/bs.podrm.2019.10.006.
14. Zhang Z. J., Osmałek T., Michniak-Kohn B. Deformable Liposomal Hydrogel for Dermal and Transdermal Delivery of Meloxicam. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;24(15):9319–9335. DOI: 10.2147/IJN.S274954.
15. Li J.-Y., Wang S., Dong Y. The effect of topical application of meloxicam on inflamed dental pulp. *Journal of Dental Sciences*. 2021;16(3):915–921. DOI: 10.1016/j.jds.2020.11.010.
16. Rastogi P., Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication*. 2019;11(4):042001. DOI: 10.1088/1758-5090/ab331e.
17. Kothale D., Verma U., Dewangan N., Jana P., Jain A., Jain D. Alginate as promising natural polymer for pharmaceutical, food, and biomedical applications. *Current Drug Delivery*. 2020;17(9):755–775. DOI: 10.2174/1567201817666200810110226.-
18. Golovanenko A. L., Rudakova I. P., Alekseeva I. V., Berezina E. S., Novikova V. V. The study of anti-inflammatory activity of new medicinal forms for the treatment of caries of the dentin. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(2):140–142. (In Russ.)
19. Kasich I. N., Ermakova L. A., Jashhinskij L. B. Experimental models of autoimmune pathological processes using Freund's Adjuvant. *Molodoj uchenyj*. 2016;29(2):18–22. (In Russ.)

REFERENCES

1. Alekseeva L. I., Taskina E. A., Kashevarova N. G. Osteoarthritis: epidemiology, classification, risk factors and progression, clinical picture, diagnosis, treatment. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. 2019;13(2):9–21. (In Russ.) DOI: 10.14412/1996-7012-2019-2-9-21.
2. Naumov A. V., Khovalasova N. O., Moroz V. I., Tkacheva O. N. Osteoarthritis and geriatric syndromes. *Zhurnal Nevrologii i Psichiatrii imeni S. S. Korsakova = S. S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2019;119(9–2):90–98. (In Russ.) DOI: 10.17116/jneuro201911909290.
3. Lisitsyna E. M., Lisitsyn M. P., Zaremuk A. M. A modern approach to the pathogenesis, diagnosis and treatment of knee osteoarthritis. *Endoskopicheskaya Khirurgiya = Endoscopic Surgery*. 2016;22(6):57–67. (In Russ.) DOI: 10.17116/endoskop201622657-67.
4. Shavlovskaya O. A. Efficacy of local insaids therapy WITH osteoarthritis different localization. *Meditinskij sovet = Medical Council*. 2017;11:18–22. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2017-18-22.

Печать таблеток рамиприла методом послойного наплавления

О. А. Терентьева^{1,2*}, К. А. Гусев^{1,2}, В. В. Тихонова¹, Д. Н. Маймистов¹, Г. А. Шандрюк³,
Е. В. Флисюк¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтеревой» Российской академии наук, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН), 119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 29

*Контактное лицо: Терентьева Оксана Андреевна. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: О. А. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; К. А. Гусев – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; В. В. Тихонова – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>; Д. Н. Маймистов – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; Г. А. Шандрюк – <https://orcid.org/0000-0003-4349-5296>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 30.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Артериальная гипертензия является одним из основных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Медикаментозное лечение артериальной гипертензии сопряжено с рядом трудностей: часто требуется комбинированная терапия несколькими лекарственными препаратами с разными дозировками, возможное изменение как дозировок, так и лекарственных препаратов во время лечения в течение жизни пациента. Создать индивидуальные лекарственные препараты необходимой дозировки позволяют современные способы трехмерной печати.

Цель. Оценить пригодность применения Kollidon® VA 64 фирмы BASF в качестве матрицеобразующего полимера для изготовления таблеток рамиприла с немедленным высвобождением, содержащих разные терапевтические дозы, напечатанные методом послойного наплавления (FDM-печать).

Материалы и методы. Субстанция: рамиприл; вспомогательные вещества: Kollidon® VA 64, Kollidon® CL-F, Soluplus®, полиэтиленгликоль 1500, натрия карбонат безводный, Poloxamer 188, натрия стеарил фумарат, маннитол; реактивы: хлористоводородная кислота, ацетонитрил для ультра-ВЭЖХ, натрия октансульфонат для ВЭЖХ, кислота ортофосфорная 85 %, натрия перхлорат чда, триэтиламин, стандартный образец рамиприла USP (№1598303). Филаменты с рамиприлом получали методом экструзии расплава на лабораторном экструдере Haake™ miniCTW (Thermo Fisher Scientific). Таблетки печатали на 3D-принтере индивидуальной сборки. Полученные FDM-печатью таблетки были изучены на истираемость, прочность на сжатие. Однородность дозирования филамента и количественное определение рамиприла и примесей в таблетках определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе жидкостном LC Shimadzu Prominence. Термический анализ проводился для филаментов и таблеток с целью определения стабильности рамиприла после температурного воздействия на дифференциальном сканирующем калориметре DSC 3+ Mettler Toledo. Также стабильность рамиприла определялась методом рамановской спектроскопии на аналитической системе комбинационного рассеяния света OPTEC-785TRS-2700.

Результаты и обсуждение. Были получены филаменты диаметром 1,75 мм, содержащие рамиприл, экструзией расплава при температуре 105 °C однородные по количественному содержанию действующего вещества. Из полученных филаментов напечатаны таблетки пяти конфигураций с тремя заполнениями: 30 %, 50 % и 100 %. Температурной деградации рамиприла в филаментах и таблетках не наблюдается. Подобран состав, позволяющий снизить температуру плавления смеси относительно матрицеобразующего полимера, что позволило понизить температуру обработки. Изучение кинетики высвобождения рамиприла из таблеток различного заполнения с крышкой и без крышки показало, что таблетки со 100 % заполнением обеспечивают немедленное высвобождение рамиприла.

Заключение. Kollidon® VA 64 пригоден в качестве матрицеобразующего полимера для изготовления таблеток рамиприла с немедленным высвобождением. Kollidon® VA 64 обеспечивает необходимые физические и технологические свойства филамента, требуемые для FDM-печати.

Ключевые слова: экструзия расплава, филамент, послойное наплавление, трехмерная печать, аддитивное производство, персонализированная медицина, напечатанные препараты, рамиприл

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

Вклад авторов. О. А. Терентьева, К. А. Гусев разработали план эксперимента и реализовали получение филаментов и таблеток рамиприла. В. В. Тихонова определяла количественное содержание рамиприла в филаментах и таблетках, получала спектры комбинационного рассеяния. Все авторы обрабатывали полученные данные, участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Выражаем благодарность за помочь в проведении анализа методом рамановской спектроскопии АО «ОПТЭК» в лице генерального директора Челибанова Владимира Петровича и инженера Ясенко Егора Андреевича. Исследования термических свойств методом ДСК выполнены в рамках Государственного задания Лаборатории модификации полимеров ИНХС РАН. Авторы благодарят компанию BASF за предоставленные образцы Kollidon® VA 64, Kollidon® CL-F, Soluplus®.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Терентьева О. А., Гусев К. А., Тихонова В. В., Маймистов Д. Н., Шандрюк Г. А., Флисюк Е. В. Печать таблеток рамиприла методом послойного наплавления. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4-1):79–87. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-79-87](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87)

Three-dimensional Printing of Ramipril Tablets by Fused Deposition Modeling

Oksana A. Terenteva^{1,2*}, Konstantin A. Gusev^{1,2}, Victoria V. Tikhonova¹, Denis N. Maimistov¹, Georgiy A. Shandryuk³, Elena V. Flisyuk¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, 9 Akad. Pavlova str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ A. V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, 29, Leninsky prospekt, Moscow, 119071, Russia

*Corresponding author: Oksana A. Terenteva. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: Oksana A. Terenteva – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; Konstantin A. Gusev – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; Victoria V. Tikhonova – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>; Denis N. Maimistov – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; Georgiy A. Shandryuk – <https://orcid.org/0000-0003-4349-5296>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 20.10.2021

Revised: 30.11.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Arterial hypertension is one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases. Drug treatment of arterial hypertension is associated with a number of difficulties: often requires combination therapy, also a possible change in either dosages or drugs during treatment during the patient's life. Three-dimensional printing allows to create individual medicines on-demand.

Aim. Study suitability of Kollidon® VA 64 as a matrix-polymer for the preparation of immediate release ramipril printing tablets.

Materials and methods. Substance: ramipril; excipients: Kollidon® VA 64, Kollidon® CL-F, Soluplus®, PEG 1500, sodium carbonate anhydrous, Poloxamer 188, sodium stearyl fumarate, mannitol; reagents: hydrochloric acid, acetonitrile for ultra-HPLC, sodium octanesulfonate for HPLC, orthophosphoric acid 85 %, sodium perchlorate analytical grade, triethylamine, standard: ramipril USP (№1598303). Ramipril filaments were prepared by hot melt extrusion on the extruder Haake™ miniCTW (Thermo Fisher Scientific). The tablets were printed on a hand-made 3D printer. The printlets were studied for friability and hardness. Uniformity and quantitative determination of ramipril and impurities in tablets and filaments were determined by high performance liquid chromatography on a Shimadzu Prominence LC liquid chromatograph. Stability of ramipril was studied on a DSC 3+ Mettler Toledo by differential scanning calorimetry. Also, the stability of ramipril was determined by the Raman spectroscopy on an analytical system ORTES-785TRS-2700.

Results and discussion. Ramipril filaments with a diameter of 1.75 mm were obtained by melt extrusion at a temperature of 105 °C. They were homogeneous in quantitative content of the active substance. From the resulting filaments, tablets were printed in five configurations with three filling densities: 30 %, 50 % and 100 %. Degradation of ramipril in filaments and tablets is not observed. The melting point of the selected mixture is lower than the melting point of matrix-polymer. It makes possible to lower the processing temperature. Tablets with 100 % filling provide an immediate release of ramipril.

Conclusion. Kollidon® VA 64 is suitable as a matrix-polymer for the development of immediate release ramipril printlets. Kollidon® VA 64 provides the necessary physical and processing properties of the filament required for FDM printing.

Keywords: hot melt extrusion, filament, fused deposition modeling, three-dimension printing, additive manufacturing, personalized medicine, printlets, ramipril

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. Oksana A. Terenteva and Konstantin A. Gusev developed and carried out the experiment. Viktoria V. Tikhonova determined the concentration of the ramipril by HPLC. Georgiy A. Shandryuk carried out the thermal analysis. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

Acknowledgment. Authors would like to express gratitude to V. P. Chelibanova and Y. A. Yashchenko for the help in the analysis by the Raman spectroscopy. The authors thank BASF for the provided samples of Kollidon® VA 64, Kollidon® CL-F, Soluplus® and the Laboratory for Polymer Modification (Moscow, Russia) for the help in the thermal analysis by DSC method.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Terenteva O. A., Gusev K. A., Tikhonova V. V., Maimistov D. N., Shandryuk G. A., Flisyuk E. V. Three-dimensional printing of ramipril tablets by fused deposition modeling. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):79–87. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-79-87](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87)

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие идет интенсивное развитие и интеграция методов трехмерной печати в разные отрасли промышленности и жизни. Она привлекает все большее внимание при разработке фармацевтических препаратов, так как позволяет решить некоторые проблемы, с которыми сталкивается традиционное производство [1]. Так производство

таблеток включает в себя несколько последовательных технологических стадий: измельчение, смешивание, гранулирование и прессование, что может привести к получению готового продукта разного качества. Технология 3D-печати обеспечила беспрецедентную гибкость в проектировании и производстве сложных объектов, которые могут быть использованы в рамках реализации персонализированной медицины [2, 3].

Трехмерная печать реализована в разных отраслях, так как позволяет создавать индивидуальные объекты необходимой геометрической формы и конфигурации по необходимости. В фармацевтической отрасли трехмерную печать применяют в процессе разработки персонализированных лекарственных средств [4, 5], разработке орфанных препаратов [6, 7], создания систем с модифицированным высвобождением [7–9] и многокомпонентных препаратов (полипиллов) [10–13]. Одним из наиболее распространенных методов трехмерной печати в фармацевтической технологии является метод послойного наплавления (FDM-печать).

FDM-печать представляет собой технологию трехмерной печати, в процессе которой создается трехмерный объект заданной геометрической формы последовательным нанесением и затвердеванием слоев расплавленных/размягченных термопластичных материалов, продавливаемых через нагретое сопло печатающей головки принтера. Данный метод позволяет получить лекарственные препараты, содержащие строго заданное количество и распределение действующего вещества, лекарственные формы определенного размера, формы, геометрии, плотности и заполнения, которые могут быть легко изменены, что отвечает потребностям персонализированной медицины. Исходные материалы обычно поставляются в виде нитей (филаментов), которые производятся методом экструзии горячего расплава. Ограничения применения данной технологии в фармацевтической области связаны с дефицитом филаментов, состоящих из материалов, пригодных для медицинского применения. Из-за возрастающего интереса к методу наплавления изготовление филаментов стало важной областью исследований. В качестве исходных материалов для изготовления филаментов обычно рассматриваются полимеры, разрешенные в фармацевтическом производстве (поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль и т. д.) [9].

Экструзия горячего расплава (ЭГР) композиции полимера и активного действующего вещества является основным способом создания филаментов для трехмерной печати. В процессе расплавления активное вещество внедряется в состав носителя, который представляет собой одно или несколько плавких веществ с добавлением функциональных вспомогательных веществ. Недостатками данного метода являются: нагревание, что ограничивает использование термолабильных веществ; невысокая скорость печати; сложность очистки оборудования. Несмотря на то, что технология экструзии горячего расплава имеет ряд ограничений, она проста и универсальна и широко используется для разработки филаментов и трёхмерной печати лекарственных препаратов.

Рамиприл – лекарственное вещество для лечения артериальной гипертензии, представляющее собой ингибитор ангиотензинпревращающего фермента. На российском рынке доступен в виде таблеток в дозировках 2,5, 5 и 10 мг, нуждается в корректировке

дозы в зависимости от уровня калия в крови и одновременного приема диуретиков [14]. Таким образом, рамиприл является хорошим кандидатом на разработку персонализированных лекарственных форм с разными дозировками.

Целью данной работы была оценка пригодности Kollidon® VA 64 (BASF) в качестве матрицеобразующего полимера для получения таблеток рамиприла с немедленным высвобождением, содержащих разные терапевтические дозы, напечатанные методом послойного наплавления (FDM-печать).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция: рамиприл ЗАО «Активный компонент» (Россия); вспомогательные вещества: сополимер поливинилпирролидона и винилацетата Kollidon® VA 64 (BASF, Германия), кросповидон Kollidon® CL-F (BASF, Германия), ПЭГ 6000-винилкапролактам-винацетат Soluplus® (BASF, Германия), полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500 (Merck, Германия), натрия карбонат безводный Na_2CO_3 (Dr. Paul Lohmann, Германия), полоксамер Poloxamer 188 (Merck, Германия), натрия стеарил фумарат Alubra™ PG-100 (FMC BioPolymer, США), маннитол 100 SD Pearlitol (Roquette, Франция); реактивы: хлористоводородная кислота х.ч. (ОАО «Каустик», Россия); ацетонитрил для ультра-ВЭЖХ (J.T. Baker, Нидерланды); натрия октансульфонат для ВЭЖХ (Panreac, Испания); кислота ортофосфорная 85 % LiChropur® (Merck, Германия); натрия перхлорат ч.д.а. (Sigma-Aldrich, США); триэтиламин (Biochem, Франция); стандартный образец рамиприла USP (№ 1598303).

Оборудование. Двухшнековый лабораторный экструдер Haake™ miniCTW, Thermo Fisher Scientific (Германия) с шнеками сонаправленного вращения; штангенциркуль электронный Matrix; тестер растворения ERWEKA DT 626/1000 HH (Германия); тестер твердости таблеток ERWEKA TBH 125 TDP (Германия); тестер истираемости таблеток ERWEKA TAR 220 (Германия); хроматограф жидкостной LC Shimadzu Prominence (Япония), детектор диодно-матричный, колонка Shim-pack GIST 250 × 4.6 5 μ m C18; аналитическая система комбинационного рассеяния света ОРТЕС-785TRS-2700 (АО «ОПТЭК», Россия); 3D-принтер; дифференциальный сканирующий калориметр DSC 3+ Mettler Toledo (Швейцария); сканирующий микроскоп Phenom XL Thermo Fisher Scientific (США).

Приготовление филамента, содержащего рамиприл. Рамиприл и вспомогательные вещества смешивали вручную, используя ступку и пестик, после опудривали натрия стеарил фумаратом. Полученную смесь загружали в питатель экструдера и экструдировали при постоянной температуре через сопло диаметром 2,0 мм при скорости вращения шнеков 20 об/мин.

Трехмерная печать таблеток рамиприла. Таблетки из филамента с рамиприлом были напечатаны методом послойного наплавления на 3D-принтере собст-

венной сборки с принципом работы экструдера буден (рисунок 1). Цифровая модель будущей лекарственной формы была разработана с помощью КОМПАС-3D версии 15.1 фирмы Аскон (Россия) и экспортирована в виде файла формата *.stl. Подготовка задания производилась в слайсере Ultimaker Cura (версия 4.6). Отправка задания на печать осуществлялась с помощью программы Repetier-Host (версия 2.1.6).

Базовые параметры печати и версия G-code установлены в соответствии с шаблоном Prusa i3. Параметры печати, специфичные для процесса, представлены в таблице 1.

Печать таблеток производилась на рабочем столе, покрытом полимерной пленкой толщиной 0,3 мм, с подогревом платформы до 65 °C.

Описание формы и размеров. Диаметр и толщину таблеток определяли на тестере твердости таблеток ERWEKA TBH 125 TDP. Диаметр филамента измерялся электронным штангенциркулем. Снимки таблеток сделаны на камеру Olympus OM-D E-M1.

Истираемость таблеток проводилась в соответствии с ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток» на приборе 1 тестера истираемости таблеток ERWEKA TAR 220.

Прочность таблеток определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» на тестере твердости таблеток ERWEKA TBH 125 TDP.

Однородность дозирования филаментов. Были взяты точные навески филамента в 6 точках, растворены в фосфатном буфере. Качественное содержание рамиприла в филаментах определялось методом ВЭЖХ.

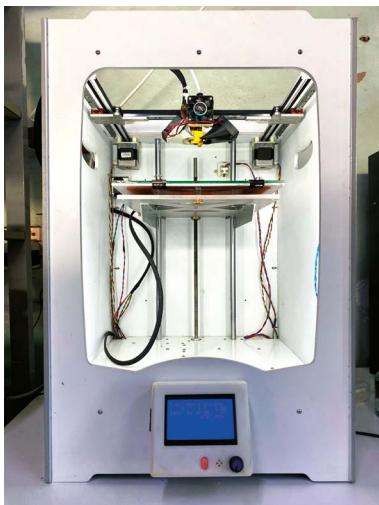


Рисунок 1. 3D-принтер, работающий по FDM технологии

Figure 1. FDM 3D printer

Таблица 1. Параметры печати таблеток рамиприла

Table 1. Ramipril tablet printing parameters

Параметры Parameters	Значение Value	Параметры Parameters	Значение Value
Форма таблетки Tablets shape	Цилиндр Cylinder	Диаметр сопла, мм Nozzle size, mm	0,6
Диаметр таблетки, мм Tablets diameter, mm	10	Диаметр филамента, мм Filament diameter, mm	1,75
Высота слоя, мм Layer height, mm	0,3	Поток, % Flow, %	110
Высота первого слоя, мм Initial layer height, mm	0,3	Длина ретракта, мм Retraction distance, mm	3
Ширина линии, мм Line width, mm	0,6	Скорость отката, мм/с Retraction speed, mm/s	50
Толщина стенки, мм Wall thickness, mm	1,2	Скорость печати, мм/с Print speed, mm/s	10
Слои крышки, шт Top layers, pcs	1	Плотность заполнения, % Infill density, %	20, 50
Слои дна, шт Bottom layers, pcs	1	Шаблон для крышки/дна Pattern of cap/bottom infill	Линии Line
Температура сопла, °C Nozzle temperature, °C	105	Шаблон заполнения Infill pattern	Сетка Grid
Скорость печати юбки, мм/с Skirt/brim speed, mm/s	5	Температура стола, °C Build plate temperature, °C	65
Скорость заполнения, мм/с Infill speed, mm/s	10	Количество линий каймы Number of brim	3
Скорость печати первого слоя, мм/с Initial layer speed, mm/s	5	Охлаждение модели, % Enable print cooling, %	0
Количество линий стенки, шт Wall lines, pcs	2	Скорость печати стенок, мм/с Wall speed, mm/s	10
Тип прилипания к столу Build plate adhesion type	Кайма Brim	Скорость перемещения, мм/с Travel speed, mm/s	150

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Рамановская спектроскопия проводилась при помощи аналитической системы комбинационного рассеяния света ОРТЕС-785TRS-2700. Мощность лазерного излучения составила 100 мВт, время экспозиции – 60, 90 и 120 с. Пробоподготовка для проведения анализа не требовалась. Обработка полученных спектральных данных проводилась при помощи специализированного программного обеспечения BWSpec 4_10.4.

Термический анализ. Измерения проводили на дифференциальном сканирующем калориметре DSC 3+ Mettler Toledo.

Метод состоял из трех последовательных сегментов: нагрев, охлаждение, нагрев в диапазоне от 0 °C до 150 °C.

Изменение температуры производилось с интенсивностью 10 К/мин, в среде азота с расходом 50 мл/мин. Использовались тигли алюминиевые стандартные на 40 мкл с перфорацией. Калибровку по температуре и энталпии проводили по чистым металлам – индию (ME-119442) и цинку (ME-119441) в соответствии с инструкциями производителя.

Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Mettler STARe версия V16.20c.

Количественное содержание рамиприла в таблетках. Исследование кинетики высвобождения рамиприла из таблеток проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIV (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм») и руководству по экспертизе лекарственных средств (том III).

Для растворения таблеток использовали аппарат I «Вращающаяся корзинка» со скоростью вращения мешалки 50 об/мин, среда растворения – 0,1 н раствор хлористоводородной кислоты объемом 500 мл, температурой $(37,0 \pm 0,5)$ °C. Точки отбора проб: 3, 5, 10, 15, 30 и 45 минут. Отобранные пробу в 5 мл (объем среды возмешали тем же растворителем) фильтровали через мембранный фильтр (RC) с диаметром пор 0,45 мкм.

Количественное содержание рамиприла определяли методом ВЭЖХ. Для этого 100 мкл раствора, полученного после проведения теста «Растворение», вводили в инжектор хроматографа, хроматографировали при изократическом режиме элюирования: скорость 0,5 мл/мин, температура термостата колонки 25 °C, время удерживания рамиприла составило около 16,5 мин.

Приготовление подвижной фазы: 0,1 % раствор натрия октансульфоната (рН = 2,4) смешивали с ацетонитрилом в соотношении 550:450. Кислотность полученного раствора составила 2,75. Коррекция рН осуществлялась при помощи ортофосфорной кислоты.

Контролируемая примесь рамиприла, главный продукт деградации, который формируется при циклизации рамиприла – это рамиприл-дикетопиперазин (примесь D), образуется в кислой среде и при нагревании.

Анализ проводили методом ВЭЖХ на хроматографе жидкостном LC Shimadzu Prominence (детектор ди-

одно-матричный, колонка Shim-pack GIST 250 × 4.6 5 мм C18), длина волны детекции 210 нм.

Методика анализа: 0,1 г (точная навеска) объекта исследования растворяли в фосфатном буфере (рН = 6,86), 100 мкл полученного раствора вводили в инжектор хроматографа, хроматографировали в градиентном режиме элюирования, скорость 1 мл/мин, температура термостата 65 °C, время удерживания рамиприла около 18 мин, относительное время удерживания примеси D составило 1,6.

Подвижная фаза состояла из растворов А и В. *Приготовление раствора А:* 2,0 г натрия перхлората растворяли в 800 мл воды очищенной, добавляли 0,5 мл триэтиламина, корректировали рН образовавшегося раствора ортофосфорной кислотой до значения 3,6, прибавляли 200 мл ацетонитрила. *Приготовление раствора В:* 2,0 г натрия перхлората растворяли в 300 мл воды очищенной и 0,5 мл триэтиламина, корректировали рН до значения 2,6, добавляли 700 мл ацетонитрила.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Субстанция рамиприла представляет собой белый порошок малорастворимый в воде. В готовой твердой лекарственной форме, содержащей рамиприл, необходимо использование слабощелочных веществ с минимизацией влаги с целью уменьшения количества примесей. Концентрация рамиприла по массе фиксировалась около 3 % на основе имеющихся исследований [13].

В качестве матрицеобразующих полимеров были выбраны сополимер винилпирролидона и винилакетата Kollidon® VA 64 (BASF, Германия) и сополимер ПЭГ 6000-винилкапролактам-винацетат Soluplus® (BASF, Германия). Они представляют собой термопластичные полимеры с невысокими температурами стеклования (101 и 70 °C соответственно). Добавление лубриканта натрия стеарил фумарата связано со сложностью загрузки порошка в питатель экструдера. Лубрикант обеспечивает хорошую сыпучесть смеси и соответственно точность загрузки. Натрия карбонат добавляли для создания слабощелочной среды в готовой лекарственной форме. Филаменты, содержащие Soluplus® были очень пластичными и оказались непригодными для последующей печати. Введение в состав маннитола, наоборот, делало филамент слишком хрупким и ломким, что негативно сказывалось на печати.

Из исследованных составов (таблица 2) пригодным для печати оказался состав № 2 с содержанием Kollidon® VA 64 77 % и рамиприла 3 %. В процессе экструзии получался филамент диаметром 1,75 мм, обладающий необходимой пластичностью, чтобы не ломаться и не застревать в печатающей головке принтера. Несмотря на то, что обычно процесс экструзии ведется на 20–30 °C выше температуры стеклования полимера (101 °C), за счет подбора компонентов удалось снизить температуру обработки до 105 °C.

Таблица 2. Составы экструдата с рамиприлом

Table 2. Components for ramipril filaments

№	Содержание веществ, % по массе Substance content, w/w								$T_{\text{экструнг}}^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{extrusion}}^{\circ}\text{C}$	
	Рамиприл Ramipril	Kollidon® VA 64	Soluplus®	ПЭГ 1500 PEG 1500	Na ₂ CO ₃ 6/8 Na ₂ CO ₃ a/h	Kollidon® CL-F	Poloxamer 188	Alubra		
1	3	70	–	15	2	5	3	2	–	100
2	3	77	–	8	2	5	3	2	–	105
3	3	56	20	10	2	5	3	1	–	100
4	4	77	–	8	2	5	3	1	–	105
5	3	65	–	20	2	–	–	–	10	100
6	3	–	77	15	5	–	–	–	–	110
7	3	–	82	10	5	–	–	–	–	100

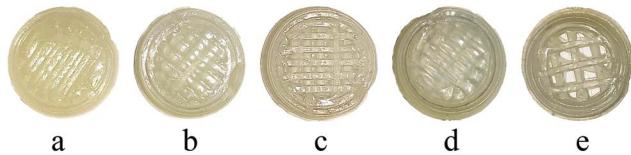


Рисунок 2. Фотографии напечатанных таблеток рамиприла с разным заполнением:

а – 100 %; б – 50 % К; в – 50 % БК; д – 30 % К; е – 30 % БК

Figure 2. Pictures of ramipril with different percentage of infill:

а – 100 %; б – 50 % С; в – 50 % NC; д – 30 % С; е – 30 % NC

Таблетки печатали в 5 вариантах заполнений: 100 %, 50 % с крышкой (К) и без крышки (БК), 30 % с крышкой (К) и без крышки (БК) (рисунок 2). Сначала создавалась в САПР трехмерная модель, в слайсере подготавливалось соответствующее задание (рисунок 3) и отправлялось на принтер.

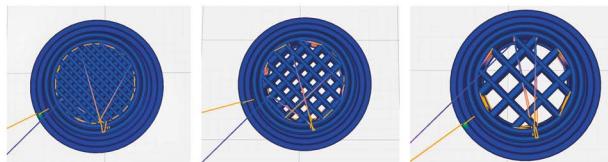


Рисунок 3. Визуализация задачи на печать таблеток с каймой и с заполнением (слева направо): 100 %, 50 %, 30 %

Figure 3. CAD models of tablets with different percentage of infill: 100 %, 50 %, 30 % with brim

Режим печати обеспечивал точное воспроизведение геометрической формы таблетки и однородность толщины слоев (рисунок 4).

Так как для напечатанных лекарственных форм нет нормативной документации, регламентирующей показатели качества, предъявляемые к ним, то полученные таблетки были исследованы на истираемость, прочность на сжатие, была определена средняя масса и отклонение от нее (таблица 3). Полученные таблет-

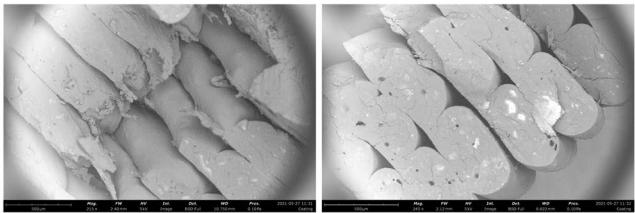


Рисунок 4. Фото электронной микроскопии края разлома таблетки

Figure 4. SEM picture of slice of tables

ки со 100 % заполнением обладали высокой прочностью, таблетки 30 % БК и 30 % К имели сравнительно низкую, но допустимую прочность. Все образцы таблеток прошли тест на истираемость.

Рамиприл подвергается температурному воздействию в процессе экструзии дольше, чем при печати, поэтому важно оценивать его стабильность в первую очередь в филаменте. При анализе кривых дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК) (рисунок 5) можно сделать вывод, что при температуре экструзии рамиприл не подвергается температурной деградации, следовательно, ожидается, что в составе, в котором находится 97 % вспомогательных веществ, которые потенциально могут оказывать изолирующее действие, рамиприл будет стабилен.

Тепловой эффект коповидона перекрывает пик плавления рамиприла, поэтому кривые ДСК для физической смеси и филамента не являются информативными, однако, подобранные соотношения компонентов позволяют снизить температуру плавления смеси относительно индивидуального Kollidon® VA 64, что позволяет понизить температуру обработки.

Рамиприл обладает кристаллической структурой. После сплавления его с подобранными вспомогательными веществами не наблюдалась характерные пики, свидетельствующие, что вещества в филаменте и таблетках находятся в кристаллической форме, что позволяет предположить, что произошло сплавление полимеров с рамиприлом и образование твердого раствора рамиприл-Kollidon® VA 64-ПЭГ (рисунок 6).

Таблица 3. Технологические параметры таблеток рамиприла

Table 3. Ramipril tablets technological parameters

Показатель качества Parameter of quality	Образцы таблеток Printlets				
	100%	50 % K 50 % C	50 % БК 50 % NC	30 % K 30 % C	30 % БК 30 % NC
Средняя масса, г Average mass, g	0,208 ± 0,019	0,166 ± 0,011	0,159 ± 0,012	0,142 ± 0,009	0,127 ± 0,015
Толщина, мм Thickness, mm	2,65 ± 0,12	2,31 ± 0,03	2,32 ± 0,07	2,40 ± 0,21	2,35 ± 0,11
Диаметр, мм Diameter, mm	10,12 ± 0,12	9,98 ± 0,11	10,08 ± 0,11	10,12 ± 0,17	10,03 ± 0,35
Истираемость, % Friability, %	0,03	0,01	0,31	0	0
Прочность на сжатие, Н Hardness, N	155,0 ± 17,6	46,0 ± 9,3	60,0 ± 8,8	35,3 ± 9,7	23,3 ± 6,7
Дозировка рамиприла, мг Ramipril loading, mg	6,12 ± 0,53	5,09 ± 0,24	4,77 ± 0,38	4,31 ± 0,32	3,76 ± 0,49

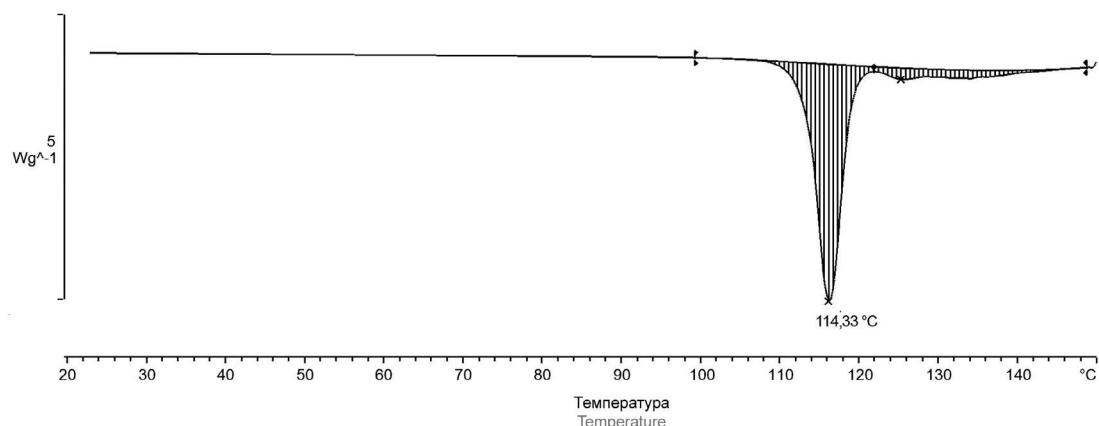


Рисунок 5. Кривая ДСК рамиприла

Figure 5. DSC plot of ramipril

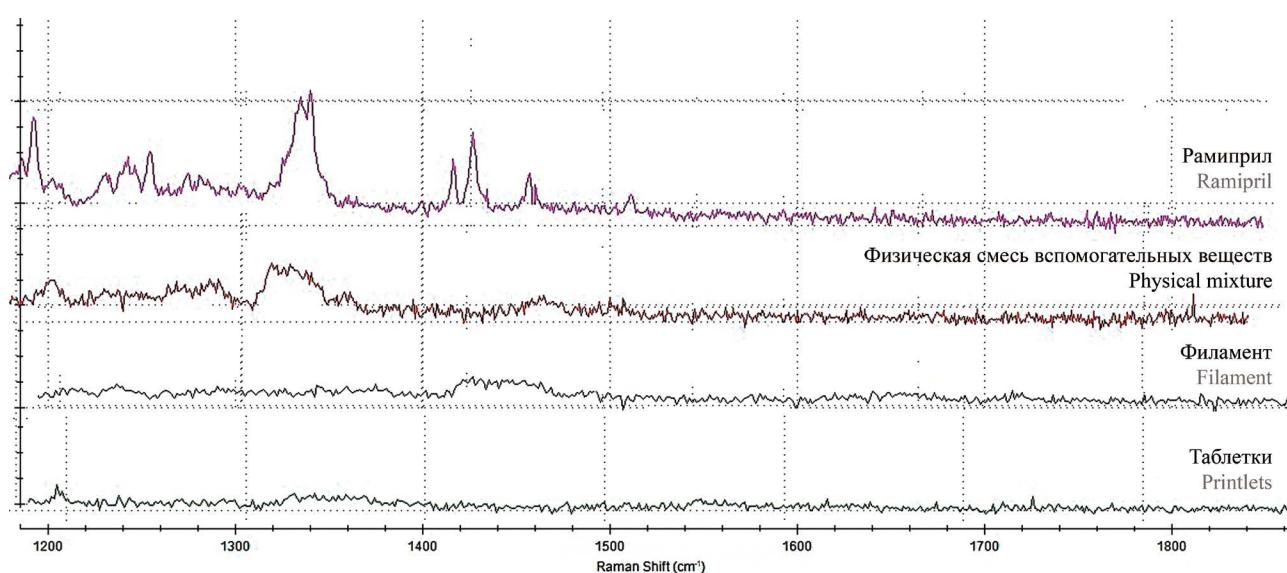


Рисунок 6. Спектры комбинационного рассеяния света субстанции рамиприла, физической смеси вспомогательных веществ, филамента и таблеток

Figure 6. Raman spectra of ramipril, physical mixture, filament and tablet

С целью доказательства того, что рамиприл при заданных температурах процесса не подвергается разложению, было определено его количественное содержание в филаментах и таблетках методом ВЭЖХ. Содержание рамиприла в филаментах составило $(3,05 \pm 0,15)\%$ от массы филамента или таблетки при 3 % загрузке. В таблетках содержание рамиприла находилось в интервале от 98 до 101 % от теоретического значения, что позволяет создавать таблетки необходимых дозировок.

С целью изучения кинетики высвобождения рамиприла из таблеток различного заполнения с крышкой и без крышки был проведен тест «Растворение». Наиболее медленное, но постепенное высвобождение рамиприла происходит из таблеток с 100 % заполнением (рисунок 7). Такие таблетки легко печатаются, имеют минимальные отклонения от средней массы и более точную дозировку. В случае 50 % заполнения отсутствие или наличие крышки не влияет существенным образом на высвобождение рамиприла. Таблетки с 30 % заполнением без крышки обеспечивают постепенное высвобождение рамиприла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

FDM-печать представляет собой метод аддитивного производства, позволяющий создавать персонализированные лекарственные формы. Данный вид печати был исследован в рамках разработки таблеток с термолабильной субстанцией – рамиприлом. Экспе-

риментально определенная температура плавления субстанции рамиприла составила 114 °С, температура начала деградации – 120 °С. Был подобран состав, снижающий температуру обработки в процессе экструзии до 105 °С, обеспечивая стабильность рамиприла. Содержание рамиприла в филаментах составляло 98–100 % от теоретического.

Из полученных филаментов печатались таблетки диаметром 10 мм с различным заполнением: 100, 50 и 30 %. Полученные таблетки успешно прошли тест на истиранию, максимальной прочностью обладали таблетки со 100 % заполнением.

Исследование кинетики высвобождения рамиприла показало, что из таблеток со 100 % заполнением рамиприл высвобождается равномерно и медленнее других образцов. Таблетки со 100 % заполнением легко печатаются, имеют минимальные отклонения от средней массы и более точную дозировку.

Таким образом, Kollidon® VA 64 пригоден в качестве матрицеобразующего полимера для изготовления таблеток рамиприла с немедленным высвобождением. Kollidon® VA 64 обеспечивает необходимые физические и технологические свойства филамента, требуемые для FDM-печати.

ЛИТЕРАТУРА

1. Douroumis D. 3D printing of pharmaceutical and medical applications: a new era. *Pharmaceutical Research*. 2019;36(3):42. DOI: 10.1007/s11095-019-2575-x.

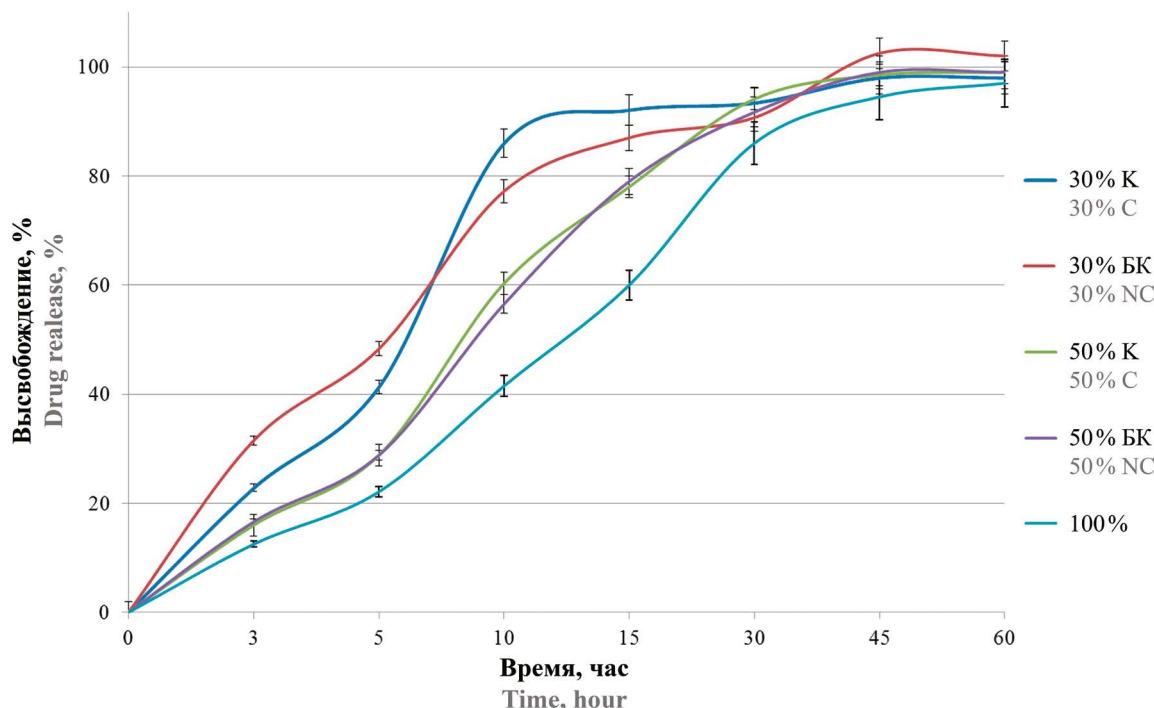


Рисунок 7. Профили высвобождения рамиприла из таблеток различного заполнения

Figure 7. Dissolution profiles of ramipril tablets with different percentage of infill

2. Souto E. B., Campos J. C., Filho S. C., Teixeira M. C., Martins-Gomes C., Zielinska A., Carbone C., Silva A. M. 3D printing in the design of pharmaceutical dosage forms. *Pharmaceutical development and technology*. 2019;24(8):1044–1053. DOI: 10.1080/10837450.2019.1620426.
3. Lamichhane S., Bashyal S., Keum T., Noh G., Seo J. E., Bastola R., Choi J., Sohn D. H., Lee S. Complex formulations, simple techniques: Can 3D printing technology be the Midas touch in pharmaceutical industry? *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2019;14(5):465–479. DOI: 10.1016/j.ajps.2018.11.008.
4. Goyanes A., Fina F., Martorana A., Sedough D., Gaisford S., Basit A. W. Development of modified release 3D printed tablets (printlets) with pharmaceutical excipients using additive manufacturing. *International Journal of pharmaceutics*. 2017;527(1–2):21–30. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.021.
5. Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing pharmaceuticals: drug development to frontline care. *Trends in pharmacological sciences*. 2018;39(5):440–451. DOI: 10.1016/j.tips.2018.02.006.
6. Chandekar A., Mishra D. K., Sharma S., Saraogi G. K., Gupta U., Gupta G. 3D printing technology: a new milestone in the development of pharmaceuticals. *Current pharmaceutical design*. 2019;25(9):937–945. DOI: 10.2174/1381612825666190507115504.
7. Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Terent'eva O. A., Semin A. A. Additive manufacturing technologies for pharmaceuticals. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;51(11):1025–1029. DOI: 10.1007/s11094-018-1733-5.
8. Goyanes A., Buanz A. B. M., Hatton G. B., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing of modified-release aminosalicylate (4-ASA and 5-ASA) tablets. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2015;89:157–162. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.12.003.
9. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В. Технологии трехмерной печати для производства лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(3):10–19.
10. Pereira B. C., Isreb A., Isreb M., Forbes R. T., Oga E. F., Alhnan M. A. Additive manufacturing of a Point-of-Care «Polypill»: fabrication of concept capsules of complex geometry with bespoke release against cardiovascular disease. *Advanced healthcare materials*. 2020;9(13):2000236. DOI: 10.1002/adhm.202000236.
11. Pereira B. C., Isreb A., Forbes R. T., Dores F., Habashy R., Petit J., Alhnan M. A., Oga E. F. «Temporary Plasticiser»: A novel solution to fabricate 3D printed patient-centred cardiovascular «Polypill» architectures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;135:94–103. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.12.009.
12. Robles-Martinez P., Xu X., Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Telford R., Basit A. W., Gaisford S. 3D printing of a multi-layered Polypill containing six drugs using a novel stereolithographic method. *Pharmaceutics*. 2019;11(6). DOI: 10.3390/pharmaceutics11060274.
13. Khaled S. A., Burley J. C., Alexander M. R., Yang J., Roberts C. J. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *Journal of controlled release*. 2015;217:308–314. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.028.
14. Шадрин А. А., Флисюк Е. В., Смехова И. Е. Исследование кинетики растворения рамиприла и лерканидипина из комбинированного лекарственного препарата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):152–156.
4. Goyanes A., Fina F., Martorana A., Sedough D., Gaisford S., Basit A. W. Development of modified release 3D printed tablets (printlets) with pharmaceutical excipients using additive manufacturing. *International Journal of pharmaceutics*. 2017;527(1–2):21–30. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.021.
5. Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing pharmaceuticals: drug development to frontline care. *Trends in pharmacological sciences*. 2018;39(5):440–451. DOI: 10.1016/j.tips.2018.02.006.
6. Chandekar A., Mishra D. K., Sharma S., Saraogi G. K., Gupta U., Gupta G. 3D printing technology: a new milestone in the development of pharmaceuticals. *Current pharmaceutical design*. 2019;25(9):937–945. DOI: 10.2174/1381612825666190507115504.
7. Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Terent'eva O. A., Semin A. A. Additive manufacturing technologies for pharmaceuticals. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;51(11):1025–1029. DOI: 10.1007/s11094-018-1733-5.
8. Goyanes A., Buanz A. B. M., Hatton G. B., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing of modified-release aminosalicylate (4-ASA and 5-ASA) tablets. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2015;89:157–162. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.12.003.
9. Blynskaya E. V., Tishkov S. V., Alekseev K. V. Three-dimensional printing technology for the production of dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(3):10–19. (In Russ.)
10. Pereira B. C., Isreb A., Isreb M., Forbes R. T., Oga E. F., Alhnan M. A. Additive manufacturing of a Point-of-Care «Polypill»: fabrication of concept capsules of complex geometry with bespoke release against cardiovascular disease. *Advanced healthcare materials*. 2020;9(13):2000236. DOI: 10.1002/adhm.202000236.
11. Pereira B. C., Isreb A., Forbes R. T., Dores F., Habashy R., Petit J., Alhnan M. A., Oga E. F. «Temporary Plasticiser»: A novel solution to fabricate 3D printed patient-centred cardiovascular «Polypill» architectures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;135:94–103. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.12.009.
12. Robles-Martinez P., Xu X., Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Telford R., Basit A. W., Gaisford S. 3D printing of a multi-layered Polypill containing six drugs using a novel stereolithographic method. *Pharmaceutics*. 2019;11(6). DOI: 10.3390/pharmaceutics11060274.
13. Khaled S. A., Burley J. C., Alexander M. R., Yang J., Roberts C. J. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *Journal of controlled release*. 2015;217:308–314. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.028.
14. Shadrin A. A., Flisyuk E. V., Smekhova I. E. Dissolution profile studies for ramipril and lercanidipine fixed-dose combination. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;(3):152–156. (In Russ.)

REFERENCES

1. Douroumis D. 3D printing of pharmaceutical and medical applications: a new era. *Pharmaceutical Research*. 2019;36(3):42. DOI: 10.1007/s11095-019-2575-x.
2. Souto E. B., Campos J. C., Filho S. C., Teixeira M. C., Martins-Gomes C., Zielinska A., Carbone C., Silva A. M. 3D printing in the design of pharmaceutical dosage forms. *Pharmaceutical development and technology*. 2019;24(8):1044–1053. DOI: 10.1080/10837450.2019.1620426.
3. Lamichhane S., Bashyal S., Keum T., Noh G., Seo J. E., Bastola R., Choi J., Sohn D. H., Lee S. Complex formulations, simple techniques: Can 3D printing technology be the Midas touch in pharmaceutical industry? *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2019;14(5):465–479. DOI: 10.1016/j.ajps.2018.11.008.

Разработка лекарственной формы мафедина в виде лиофилизата для парентерального введения

О. А. Терентьева^{1,2*}, В. А. Вайнштейн¹, В. В. Тихонова¹, А. К. Уэйли¹, М. А. Трофимов^{1,3},
В. А. Приходько^{1,2}, Л. В. Шигарова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтеревой» Российской академии наук, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук», 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, литер А

*Контактное лицо: Терентьева Оксана Андреевна. E-mail: oksana.terenteva@pharminnotech.com

ORCID: О. А. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; В. А. Вайнштейн – [0000-0003-2304-7605](https://orcid.org/0000-0003-2304-7605); В. В. Тихонова – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>;
А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; М. А. Трофимов – <https://orcid.org/0000-0002-7749-0054>; В. А. Приходько – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;
Л. В. Шигарова – <https://orcid.org/0000-0002-9578-6418>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 02.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются важнейшей медико-социальной проблемой современной неврологии, поскольку имеют самые высокие показатели заболеваемости, смертности и инвалидизации среди населения. Растущая заболеваемость ЦВЗ в результате старения населения во всем мире требует срочной разработки терапевтических, диагностических и профилактических средств. Однако разработка лекарственных препаратов для лечения заболеваний мозга имеет ограничения за счет наличия гематоэнцефалического барьера, который защищает мозг от попадания большинства молекул из кровотока в центральную нервную систему (ЦНС). В ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университете» Минздрава России был синтезирован агонист альфа-2-адренорецепторов мафедин, который может быть использован как нейропротекторное и нейрореабилитационное средство при черепно-мозговой травме, обладает мягким психостимулирующим и анксиогенным действием.

Цель. Разработка лекарственной формы мафедина с целью улучшения его проникающей способности в ЦНС и увеличения стабильности в готовой лекарственной форме.

Материалы и методы. Субстанция мафедина [6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропириимидин-4-олят натрия]; лецитин, спен-60, твин-80, полоксамер 188, маннитол, токоферола ацетат, аскорбиновая кислота, метиленхлорид (МХ), диметилсульфоксид, ацетонитрил, кислота трифторуксусная. Тонкую эмульсию мафедина получали обработкой ультразвуком. Готовую лекарственную форму получали лиофильным высушиванием. Остаточные растворители определяли методом газовой хроматографии на газовом хроматографе. Качественное содержание мафедина определяли методом высокоеффективной жидкостной хроматографии. Размер частиц эмульсии и дзета-потенциал определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS.

Результаты и обсуждение. Получена готовая лекарственная форма мафедина в виде лиофилизата, представляющая собой пористую таблетку светло-желтого цвета, без запаха. Средняя масса сухой таблетки составила $(0,17 \pm 0,01)$ г с содержанием мафедина (26 ± 1) мг. Содержание воды в лиофилизате составило 3,85 %. Качественное содержание МХ в лиофилизате соответствовало требованиям, предъявляемым к содержанию остаточных растворителей. Время восстановления лиофилизата в первичную эмульсию составляло 3–5 секунд. Восстановленная дисперсия имела желтый цвет, не имела запаха, не расслаивалась в течение 2 суток при хранении. pH восстановленной ЛФ составляло 7,34. Средний размер частиц – $164,7 \pm 6,4$ нм, дзета-потенциал – -32 мВ.

Заключение. Разработанная лекарственная форма стабильна по физико-химическим и фармацевтическим показателям и предназначена для экспериментального изучения на моделях в качестве нейропротекторного и нейрореабилитационного средства.

Ключевые слова: мафедин, лиофилизат, лекарственная форма, криопротектор, маннитол, нейропротекция

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

Вклад авторов. В. А. Вайнштейн разработали план эксперимента. О. А. Терентьева провела эксперимент, получила готовую лекарственную форму мафедина. В. В. Тихонова определяла остаточные растворители в лиофилизате. А. К. Уэйли определяла количественное содержание мафедина. М. А. Трофимов определял размер частиц и потенциал эмульсии. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Тихонова В. В., Уэйли А. К., Трофимов М. А., Приходько В. А., Шигарова Л. В. Разработка лекарственной формы мафедина в виде лиофилизата для парентерального введения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):88–94. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-88-94](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-88-94)

Development of a Mafedine Lyophilizate for Parenteral Use

Оксана А. Терентьева^{1,2*}, Виктор А. Вайнштейн¹, Виктория В. Тихонова¹, Андрей К. Уэйли¹,
Михаил А. Трофимов^{1,3}, Вероника А. Приходько^{1,2}, Лариса В. Шигарова¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, 9, Akad. Pavlova str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, 8/3A, Khlopina str., St. Petersburg, 194021, Russia

© Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Тихонова В. В., Уэйли А. К., Трофимов М. А., Приходько В. А., Шигарова Л. В., 2021
© Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Tikhonova V. V., Whaley A. K., Trofimov M. A., Prikhodko V. A., Shigarova L. V., 2021

*Corresponding author: Oksana A. Terenteva. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: Oksana A. Terenteva – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; Victor A. Vainshtein – 0000-0003-2304-7605; Victoria V. Tikhonova – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Mikhail A. Trofimov – <https://orcid.org/0000-0002-7749-0054>; Veronika A. Prikhodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Larisa V. Shigarova – <https://orcid.org/0000-0002-9578-6418>.

Received: 20.10.2021

Revised: 02.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Cerebrovascular disease (CVD) is the most important medical and social problem of modern neurology because they have the highest rates of morbidity, mortality and disablement in the population. The growing incidence of CVD as a result of an aging population worldwide requires the emergent development of therapeutics, diagnostic and preventive tools. However, the development of drugs for the treatment of brain diseases has limitations due to the presence of the blood-brain barrier, which protects the brain against most molecules from the bloodstream entering the central nervous system. At the St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia the alpha-2 adrenergic agonist mafedine was synthesized, which has mild psychostimulant and anxiogenic effects and which may be used in the treatment of traumatic brain injury as a neuroprotective agent.

Aim. The development of a dosage form of mafedine in order to improve its penetration into the central nervous system.

Materials and methods. Mafedine (pharmaceutical substance) [6-oxo-1-phenyl-2-(phenylamino)-1,6-dihydropyrimidin-4-olate sodium] (St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia); lecithin, span-60, Tween-80, Poloxamer 188, mannitol, vitamin E, ascorbic acid, methylene chloride, dimethyl sulfoxide, acetonitrile, trifluoroacetic acid. The fine emulsion of mafedine was obtained by ultrasound. The dosage form of mafedine was obtained by freeze drying. Residual solvents were determined by gas chromatography. Quantitative analysis of mafedine was performed by high-performance liquid chromatography. Particle size and zeta potential of emulsion were determined on a Zetasizer Nano ZS.

Results and discussion. Lyophilizate of mafedine was obtained and presenting as a light yellow porous, odorless tablet. The average mass of dry tablet was $(0,17 \pm 0,01)$ g with mafedine content is (26 ± 1) mg. The water content in the lyophilizate was 3,85 %. The quantity of methylene chloride in the lyophilizate correspond to the requirements for residual solvent content. The reconstitution time of lyophilizate into a primary emulsion was 3–5 seconds. The reconstituted dispersion was yellow, odorless, and did not break within 2 days during storage. The pH of the reconstituted emulsion was 7,34. The average particle size was $(164,7 \pm 6,4)$ nm, the zeta potential was -32 mV.

Conclusion. The developed dosage form is stable according to its physicochemical and pharmaceutical characteristics and is suitable for experimental study on models as a neuroprotective and neurorehabilitation agent.

Keywords: mafedine, lyophilizate, dosage form, cryoprotectant, mannitol, neuroprotection

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. Victor A. Vainshtein designed the experiment plan. Oksana A. Terenteva carried out the experiment and obtained the finished dosage form of mafedine. Victoria V. Tikhonova determined the residual solvents in the lyophilizate. Andrei K. Whaley determined the quantitative analysis of mafedine. Mikhail A. Trofimov determined particle size and emulsion zeta potential. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Tikhonova V. V., Whaley A. K., Trofimov M. A., Prikhodko V. A., Shigarova L. V. Development of a mafedine lyophilizate for parenteral use. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):88–94. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-88-94](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-88-94)

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются важнейшей медико-социальной проблемой современной неврологии, поскольку имеют самые высокие показатели заболеваемости, смертности и инвалидизации среди населения, особенно во время пандемии COVID-19 [1–3]. Растущая заболеваемость ЦВЗ в результате старения населения во всем мире требует срочной разработки терапевтических, диагностических и профилактических средств [4]. Однако разработка лекарственных препаратов (ЛП) для лечения заболеваний мозга имеет ограничения за счет наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который представляет собой уникальную регулирующую систему капилляров головного мозга, защищающую мозг, предотвращая попадание большинства молекул из

кровотока в центральную нервную систему (ЦНС) [5]. Таким образом, в отличие от других органов человеческого тела, более 98 % малых молекул и почти 100 % больших терапевтических молекул не могут попасть в мозг через систему кровообращения.

Одним из путей доставки лекарственных веществ в ЦНС в обход ГЭБ является их доставка через систему кровообращения в результате кратковременного нарушения ГЭБ, вызванного биологическими, химическими или физическими воздействиями. Однако эти способы доставки лекарств в ЦНС не получили широкого распространения, поскольку они рискованы, дороги или не подходят для лечения менее локализованных заболеваний ЦНС [6, 7].

Одним из способов минимизировать вышеупомянутые побочные эффекты является создание условий и систем доставки лекарственных веществ, улучша-

ющих проницаемость ГЭБ. Одним из первых способов повышения проницаемости ГЭБ для гидрофильных веществ была техника изменения осмотического давления вблизи ГЭБ за счет введения раствора маннитола. Гипертонический раствор маннитола вызывает дегидратацию эпителиальных клеток, что приводит к раскрытию эпителиальных плотных соединений и увеличению проницаемости ГЭБ.

Для нервной ткани характерно высокое содержание липидов. Поэтому введение в состав лекарственной формы (ЛФ) липидов увеличивает сродство лекарственных веществ к нервным тканям.

Наиболее перспективным методом увеличения проницаемости ГЭБ является создание нано- и микроразмерных систем доставки. Доставляя вещества к заданной мишени, носители лекарственных веществ увеличивают специфичность и эффективность проводимой терапии, снижая их токсическое действие.

В ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете» Минздрава России был синтезирован агонист альфа-2-адренорецепторов 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия (мафедин) (патент РФ 2669555), который может быть использован как нейропротекторное и нейрореабилитационное средство при черепно-мозговой травме, обладает мягким психостимулирующим и анксиогенным действием.

В серии пилотных экспериментов на различных видах животных мафедин (в виде основания) оказывал выраженный гипотензивный эффект, обусловленный активацией центральных альфа-2-адренорецепторов. В отличие от другого альфа-2-агониста клонидина, мафедин обладал более длительным, равномерным и продолжительным действием, не вызывал синдрома отмены, а также в значительно меньшей степени угнетал центральную нервную систему [8]. На основании указанных особенностей механизма действия данного соединения было сделано предположение о наличии у него потенциальной нейропротекторной активности. Позднее механизм действия мафедина был уточнен в эксперименте на рыбах *Danio rerio*, и в качестве его основной молекулярной мишени были предложены центральные адренорецепторы альфа-2С-подтипа, воздействием на которые объяснялось его мягкое психостимулирующее действие [9].

На модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс натриевая соль мафедина (2,5 мг/кг) при курсовом введении в течение 1 недели уменьшала объем повреждения головного мозга и выраженность воспалительных процессов в области повреждения, а также улучшала восстановление общей двигательной активности животных и функции передних и задних конечностей [10]. Введение мафедина способствовало нормализации межполушарных связей отделов коры, удаленных от области повреждения, а также внутриполушарных связей здорового полушария на

7-й день после травмы. Помимо этого, препарат оказывал положительное влияние на динамику рефлексорных ответов коры головного мозга при фото- и соматосенсорной стимуляции в острый период ЧМТ [11].

Мафедин подвергается гидролизу и разлагается на свету, поэтому при разработке ЛП применялась технология лиофилизации, в процессе которой происходит удаление растворителя из замороженного образца. Однако в процессе замораживания и лиофилизации с образцами могут происходить нежелательные физические процессы, поэтому необходимо использовать криопротекторы. В качестве криопротекторов чаще всего используют многоатомные спирты (маннитол, сорбитол) и сахара (трегалоза, сахароза, лактоза) [12]. Маннитол наиболее распространенный криопротектор, применяемый в технологии лиофилизации из-за экономической доступности и способности не кристаллизоваться во время замораживания, сохраняя микроскопическую структуру лиофилизата [13, 14].

Целью данного исследования являлась разработка ЛФ мафедина с целью улучшения его проникающей способности в ЦНС и увеличения стабильности в готовой ЛФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция: мафедин [6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия] (ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России) (рисунок 1); вспомогательные вещества: лецитин Ультралек Р (ADM, США), сорбитана моностеарат (спен-60) RADIAMULS SORB® (OLEON NV, Бельгия), твин-80 (Merck, Германия), полоксамер 188 (Merck, Германия), маннитол 100 SD Pearlitol (Roquette, Франция), токоферола ацетат (Марбифарм, Россия), аскорбиновая кислота (ЗАО «ФП Мелиген», Россия); реагенты: метиленхлорид (MX) (АО «Экос-1», Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (АО «Экос-1», Россия), ацетонитрил (J.T. Baker, Польша), кислота трифтормукусная (ТФУ) х.ч. (Chemical-Line, Россия).

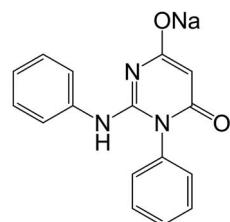


Рисунок 1. Структурная формула мафедина

Figure 1. The structural formula of mafedine

Оборудование: лиофильная сушилка FreeZone 4.5 Labconco, США; ультразвуковая ванна Сапфир – ТТЦ (РМД) ООО «Сапфир», Россия; центрифуга MPW-351;

pH метр Аквилон РН 410; магнитная мешалка IKA C-MAG HS 7; климатическая камера Memmert HPP 110; весы аналитические Сартогосм СЕ 224-С; анализатор частиц Zetasizer Nano ZS; титратор волюметрический Easy KFV, Mettler Toledo; хроматограф газовый Shimadzu GC-2010Plus, Япония (детектор ионизационно-пламенный, колонка RTX-1301, 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм); высокоеффективный жидкостной хроматограф Prominence LC-20 Shimadzu, Япония (диодно-матричный детектор SPD-M20A, автосемпллер SIL-20A), обращенно-фазовая колонка SUPELCOSIL LC-18 (250*4,6) с зернением 5 мкм; система очистки воды «Arium mini» (Sartorius, Германия).

Стабильность мафедина в растворе в зависимости от pH.

Для оценки влияния pH раствора на стабильность мафедина готовили образцы смешиванием 5 мл фосфатных буферных растворов с значением pH от 3,91 до 9,18 с шагом 0,5 и 0,05 г субстанции мафедина. Все образцы помещались в климатическую камеру при температуре 40 °C и относительной влажности воздуха 35,5 %, где выдерживались в течение 15 суток. Стабильность мафедина в растворах оценивали визуально по изменению окраски.

Приготовление эмульсии мафедина.

Приготовление водного раствора: в стеклянный флакон с ацетатным буферным раствором pH 6,5 (1000 мл воды очищенной, 0,159 г ледяной уксусной кислоты, 20,055 г ацетата натрия тригидрата) или водой для инъекций последовательно вносили маннитол, полоксамер 188, твин 80, аскорбиновую кислоту, мафедин, вакуумировали и растворяли при перемешивании на магнитной мешалке. Полученный раствор фильтровали через фильтр 0,45 мкм под давлением.

Приготовление раствора в MX: в стеклянном флаконе в MX растворяли лецитин, спен 60, токоферола ацетат.

Готовый раствор MX приливали к водному раствору, энергично перемешивая взбалтыванием. Полученную эмульсию озвучивали в ультразвуковой ванне без нагревания в течение 15 минут. После получения стабильной эмульсии, MX отгоняли в вытяжном шкафу при озвучивании и температуре 70 °C в течение 15 минут до исчезновения специфического запаха MX.

Исследуемые составы приведены в таблице 1.

Получение лиофилизата.

Эмульсию разливали во флаконы по 1 мл и замораживали в лиофильной сушилке при температуре -50 °C в течение 24 ч, после чего высушивали в глубоком вакууме в течение 2 суток. Полученный лиофилизат укупоривали пробками.

Параметры контроля качества полученного лиофилизата.

1. Однородность массы определяли в соответствии ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм».
2. Остаточную влажность определяли в соответствии ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды» методом Карла Фишера по методике А.

Таблица 1. Состав опытных эмульсий мафедина

Table 1. Experimental compositions of mafedine emulsions

Состав Composition	1	2	3	4	5
	Состав в % по массе Substance content, w/w				
Мафедин Mafedine	5	10	15	15	15
Лецитин Lecithin	10	15	20	20	20
Сухая желчь Dry bile	3	3	-	-	-
Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	-	-	-	1	-
Спен 60 Span-60	2	-	2	2	2
Твин-80 Tween-80	1	-	2	2	2
Полоксамер 188 Poloxamer 188	20	20	20	20	20
Маннитол Mannitol	58	51	40	39	40
Токоферола ацетат Vitamin E	1	1	1	1	1
Итого Total	100	100	100	100	100
	Объем растворителя на 5 г сухих веществ, мл Solvent volume/5g substances				
MX Methylene chloride	20	20	20	20	20
Вода для инъекций Water for injections	30	30	30	-	-
Ацетатный буфер pH = 6,5 Sodium acetate buffer pH = 6,5	-	-	-	30	30

3. Время диспергирования лиофилизата водой для инъекций.
4. Описание цвета восстановленной ЛФ проводилось визуальным методом.
5. Размер частиц и дзета-потенциал восстановленной ЛФ определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS.
6. Определение водородного показателя (pH) восстановленной ЛФ проводили в соответствии ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия».
7. Качественное и количественное содержание MX проводили в соответствии с ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители». Режим работы термостата колонки: 20 минут от начала анализа поддерживалась температура 40 °C, затем со скоростью 10 °C/мин температура увеличивалась до 240 °C и оставалась такой на протяжении 20 минут. 0,2 г (точная навеска) анализируемой субстанции мафедина помещали в пеницилловый флакон, растворяли в 5 мл ДМСО, укупоривали

под обкатку. Далее термостатировали в сушильном шкафу при температуре 85 °C 20 минут, отбирали 1 мл газовой фазы и вводили в инжектор хроматографа.

8. Количественное определение мафедина в субстанции проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при длине волны 278 нм. Анализы проводили на обращенно-фазовой колонке при температуре 40 °C со скоростью потока 1 мл/мин. Ввод пробы объемом 10 мкл осуществлялся автосамплером.

В качестве стандарта применяли субстанцию мафедина, полученную путем химического синтеза на базе лаборатории органического синтеза ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета» Минздрава России и очищенную путем растворения, фильтрации через фильтр 0,22 мкм и сублимационной сушки. Для подвижной фазы использовали ацетонитрил класса ВЭЖХ, воду деионизированную, полученную с помощью системы очистки воды, и ТФУ в качестве добавки.

Исследования проводили в градиентном режиме, используя в качестве подвижной фазы «А» деионизованную воду с 0,1 % об. ТФУ и в качестве подвижной фазы «В» ацетонитрил с 0,1 % об. ТФУ (таблица 2).

Таблица 2. Программа градиента хроматографического анализа

Table 2. Gradient chromatographic analysis program

Время, мин Time, min	% элюента В в подвижной фазе Percentage of eluent B in the mobile phase
0	5%
5,0	5%
45,75	100%
50,0	100%
60,0	5%
65,0	5%

Время удерживания в приведенных условиях составило (21,84 ± 0,01) мин (рисунок 2).

Количественное определение мафедина в субстанции проводилось методом абсолютной градуировки по площади пиков. Для построения калибровочной кривой были подготовлены 5 стандартных растворов мафедина следующих концентраций: 0,0014; 0,0033; 0,0047; 0,0061 и 0,0080 мг/мл, на основе анализа которых создавался калибровочный график зависимости концентрации вещества от площади его хроматографического пика. В результате уравнение регрессии имело вид:

$$y = 16040000x - 77079,9; R^2 = 0,9999.$$

С целью определения количественного содержания мафедина в ЛФ определенное количество субстанции мафедина полностью растворяли в смеси EtOH:H₂O (3:1). Полученный раствор ЛФ затем переносился в мерную колбу на 25 мл, где доводили объем до метки исходной смесью EtOH:H₂O (3:1). После чего из мерной колбы отбиралась пробы на ВЭЖХ анализ.

Для определения доли мафедина в ЛФ, оставшегося в воде после полного разрушения супензии, определенное количество ЛФ сперва супензировалась в 1 мл дистиллированной воды, а затем центрифугировалась при 12 000 об/мин в течении 10 минут. Впоследствии, из полученного супернатанта отбиралась пробы на ВЭЖХ анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субстанция мафедина представляет собой белый порошок, без вкуса, запаха и видимых включений, является гигроскопичной и поглощает влагу из окружающей среды при хранении, легко растворима в воде, практически нерастворима в МХ, бутилацетате, петролейном эфире. Содержание воды в субстанции составляло (5,54 ± 0,21) %.

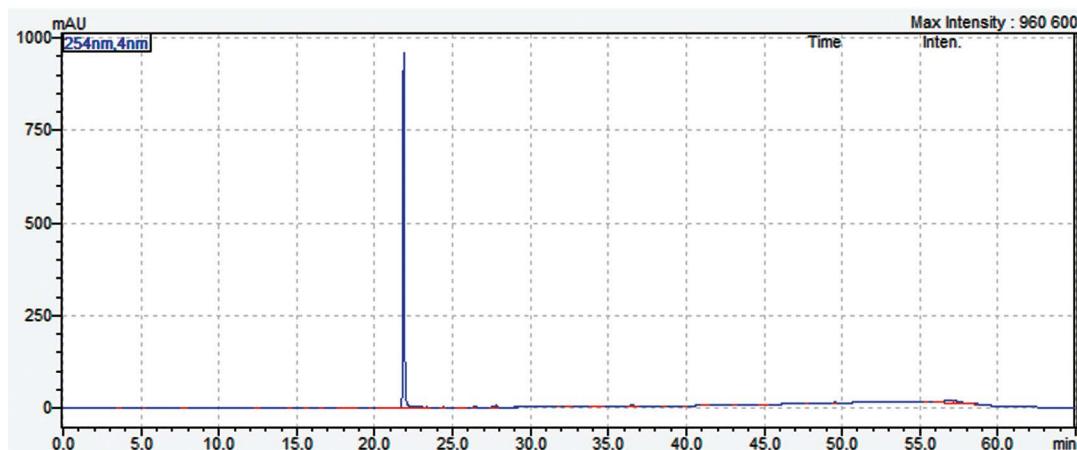


Рисунок 2. Хроматограмма стандартного образца мафедина

Figure 2. The chromatogram of a standard sample of mafedine

Мафедин стабилен в растворах в интервале рН от 6,5 до 7,5. Поэтому эмульсию готовили в ацетатном буферном растворе рН 6,5.

Для предотвращения окисления мафедина добавляли кислоту аскорбиновую, однако наличие ее в составе усиливало появление сиреневой окраски, вероятно, из-за проявления прооксидантных свойств. В конечный состав ЛФ аскорбиновую кислоту не вводили.

Эмульсии, содержащие желчь, расслаивались без какого-либо физического воздействия. Эмульсии состава № 3 и № 5 имели желтый цвет, цвет лецитина, а эмульсия, содержащая в составе аскорбиновую кислоту, была оранжевого цвета.

Стабильность эмульсий проверяли центрифугированием при скорости 1000, 2000 и 4000 об/мин в течение 10 минут. Состав № 5 показал стабильность и не расслаивался, в то время как состав № 3 расслоился при центрифугировании со скоростью 1000 об/мин.

Стабильность эмульсии № 5 проверяли также методом замораживания-оттаивания. Для этого эмульсию замораживали в этаноле при -25°C и оттаивали при комнатной температуре. Проводили 4 таких последовательных цикла. Эмульсия не расслоилась, что говорит о ее высокой стабильности.

Лиофильно высушенная эмульсия состава № 5 представляла собой пористую таблетку светло-желтого цвета, без запаха; и была предложена в качестве готовой ЛФ для приготовления супензии. Средняя масса сухой таблетки составила $(0,17 \pm 0,01)$ г с содержанием мафедина (26 ± 1) мг. Содержание воды в лиофилизате составило 3,85 %.

Количественное содержание МХ в лиофилизате было 0,013 %, что соответствует требованиям, предъявляемым к содержанию остаточных растворителей 2 класса опасности.

Лиофилизат восстанавливали в первичную эмульсию водой для инъекций, время диспергирования составляло 3–5 секунд. Восстановленная дисперсия имела желтый цвет, не имела запаха, не расслаивалась в течение 2 суток при хранении. рН восстановленной ЛФ составляло 7,34, что соответствует рН крови. Средний размер частиц восстановленной ЛФ составил $164,7 \pm 6,4$ нм, дзета-потенциал – -32 мВ, что свидетельствует о том, что эмульсия стабильна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная лекарственная форма стабильна по физико-химическим и фармацевтическим показателям, по своим характеристикам может быть пригодна для парентерального введения, и при наличии способности проникать через ГЭБ обеспечить улучшенную проницаемость мафедина в ЦНС, где он будет оказывать свое терапевтическое действие. Однако для подтверждения фармакологи-

ческих свойств данной лекарственной формы необходимо его экспериментальное изучение на живых системах в качестве нейропротекторного и нейрореабилитационного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li Y., Li M., Wang M., Zhou Y. et al. Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study. *Stroke and vascular neurology*. 2020;5(3):279–284. DOI: 10.1136/svn-2020-000431.
2. Singh A. K., Gillies C. L., Singh R., Singh A., Chudasama Y., Coles B., Seidu S., Zaccardi F., Davies M. J., Khunti K. Prevalence of comorbidities and their association with mortality in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes obesity and metabolism*. 2020;22(10):1915–1924. DOI: 10.1111/dom.14124.
3. Pranata R., Huang I., Lim M. A., Wahjoepramono E. J., July J. Impact of cerebrovascular and cardiovascular diseases on mortality and severity of COVID-19 – systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*. 2020;29(8):104949. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104949.
4. Shah R., Wilkins E., Nichols M., Kelly P., El-Sadi F., Wright F. L., Townsend N. Epidemiology report: trends in sex-specific cerebrovascular disease mortality in Europe based on WHO mortality data. *European heart journal*. 2019;40:755–764. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy378.
5. Małkiewicz M. A., Szarmach A., Sabisz A., Cubała W. J., Szurowska E., Winklewski P. J. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16:15. DOI: 10.1186/s12974-019-1403-x.
6. Skorobogatova A. I., Terent'eva O. A., Vainstein V. A., Okovitij S. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Targeted transport as a promising method of drug delivery to the central nervous system: A Review. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):845–851. DOI: 10.1007/s11094-019-02088-8.
7. Новикова А. А., Кезимана П., Станишевский Я. М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):134–138.
8. Анисимова Н. А. Фармакологическая активность мафедина: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 1984. Доступно по: <https://e-catalog.nlb.by/Record/BY-NLB-rr36182120000>. Ссылка активна на 02.12.2021.
9. Sysoev Yu. I., Meshalkina D. A., Petrov D. V., Okovityi S. V., Musienko P. E., Kalueff A. V. Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenergic receptor agonist, mafedine, in zebrafish. *Neurosci Lett*. 2019;701:234–239. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.03.001.
10. Сысоев Ю. И., Дагаев С. Г., Кубарская Л. Г., Гайкова О. Н., Узугубанам Б. Ч., Модисе К., Маквана Т. Л., Оковитый С. В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
11. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sci*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
12. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В., Минаев С. В. Создание лиофилизата ГК-2 для приготовления раствора для инъекций с применением полиолов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;2(23):26–31.
13. Краснюк И. И., Тарасов В. В., Козлова Ж. М., Степанова О. И., Краснюк (мл.) И. И., Кугач В. В. Выбор криопротектора для лиофилизации тритикаина- α . *Вестник фармации*. 2019;1(83):49–53.
14. Liao X., Krishnamurthy R., Suryanarayanan R. Influence of processing conditions on the physical state of mannitol-implications in freeze-drying. *Pharmaceutical research*. 2007;24:370–376. DOI: 10.1007/s11095-006-9158-3.

REFERENCES

1. Li Y., Li M., Wang M., Zhou Y. et al. Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study. *Stroke and vascular neurology*. 2020;5(3):279–284. DOI: 10.1136/svn-2020-000431.
2. Singh A. K., Gillies C. L., Singh R., Singh A., Chudasama Y., Coles B., Seidu S., Zaccardi F., Davies M. J., Khunti K. Prevalence of comorbidities and their association with mortality in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes obesity and metabolism*. 2020;22(10):1915–1924. DOI: 10.1111/dom.14124.
3. Pranata R., Huang I., Lim M. A., Wahjoepramono E. J., July J. Impact of cerebrovascular and cardiovascular diseases on mortality and severity of COVID-19 – systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*. 2020;29(8):104949. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104949.
4. Shah R., Wilkins E., Nichols M., Kelly P., El-Sadi F., Wright F. L., Townsend N. Epidemiology report: trends in sex-specific cerebrovascular disease mortality in Europe based on WHO mortality data. *European heart journal*. 2019;40:755–764. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy378.
5. Małkiewicz M. A., Szarmach A., Sabisz A., Cubała W. J., Szurowska E., Winklewski P. J. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16:15. DOI: 10.1186/s12974-019-1403-x.
6. Skorobogatova A. I., Terent'eva O. A., Vainstein V. A., Okovitij S. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Targeted transport as a promising method of drug delivery to the central nervous system: A Review. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):845–851. DOI: 10.1007/s11094-019-02088-8.
7. Novikova A. A., Kezimana P., Stanishevskiy Ya. M. Methods of obtaining liposomes, used as drug delivery systems. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;(2):134–138. (In Russ.)
8. Anisimova H. A. *Pharmacologicheskaya aktivnost' mafedina* [Mafedine pharmacological activity] [dissertation]. St. Petersburg; 1984. Available at: <https://e-catalog.nlb.by/Record/BY-NLB-rr36182120000>. Accessed: 02.12.2021. (In Russ.)
9. Sysoev Yu. I., Meshalkina D. A., Petrov D. V., Okovityi S. V., Musienko P. E., Kalueff A. V. Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenergic receptor agonist, mafedine, in zebrafish. *Neurosci Lett*. 2019;701:234–239. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.03.001.
10. Sysoev Yu. I., Dagaev S. G., Kubarskaya L. G., Gajkova O. N., Uzuegbunam B. Ch., Modise K., Makvana T. L., Okovityi S. V. Neuroprotective activity of the alpha-2 adrenergic agonist mafedine on model of traumatic brain injury in rats. *Biomed*. 2019;15(1):62–77. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
11. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idrisatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sci*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
12. Blynskay E. V., Tishkov S. V., Alekseyev K. V., Minaev S. V. Creation of liophilisate of GK-2 for preparation of solution for injections with use of polyols. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;2(23):26–31. (In Russ.).
13. Krasnyuk I. I., Tarasov V. V., Kozlova Zh. M., Stepanova O. I., Krasnyuk I. I. (jn), Kuhach V. V. The choice of a cryoprotector for tetricain- α lyophilization. *Vestnik pharmaci = Pharmacy Bulletin*. 2019;1(83):49–53.
14. Liao X., Krishnamurthy R., Suryanarayanan R. Influence of processing conditions on the physical state of mannitol-implications in freeze-drying. *Pharmaceutical research*. 2007;24:370–376. DOI: 10.1007/s11095-006-9158-3.

Сравнительный ГХ-МС анализ состава метаболитов надземной и подземной части сабельника болотного (*Comarum palustre* L.)

Й. Стругар, А. А. Орлова*, М. Н. Повыдыш

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Орлова Анастасия Андреевна. E-mail: anastasiya.lebedkova@spcpu.ru

ORCID: Й. Стругар – <https://orcid.org/0000-0002-0816-2579>; А. А. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-7836-578>; М. Н. Повыдыш – <https://orcid.org/0000-0002-7768-905>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 23.11.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Понимание механизмов накопления отдельных групп биологически активных веществ в перспективных видах сырья и возможности их прогнозирования важно для решения фундаментальных и прикладных задач фармацевтики. На сегодняшний день выявлены различия качественного и количественного состава вторичных метаболитов в надземной и подземной части сабельника болотного, однако остается не исследованным вопрос, касающийся природы проявления данных различий.

Цель. Сравнительное метаболомное изучение состава первичных метаболитов надземной и подземной части сабельника болотного.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали надземную и подземную часть сабельника болотного, заготовленные в окрестностях питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в 2019 году и высушенные воздушно-тепвенным методом. Метаболомные исследования проводили с использованием метода ГХ-МС. Статистическую обработку проводили на платформе MetaboAnalyst 5.0.

Результаты и обсуждение. При анализе хроматограмм, полученных с использованием метода ГХ-МС, выявлено содержание 933 первичных метаболита в надземной и подземной части сабельника болотного, 120 из которых были идентифицированы. С использованием ряда статистических методов выявлено 10 метаболитов из групп моносахаридов, органических кислот и спиртов, вносящих наибольший вклад в проявление различий между исследуемыми образцами.

Заключение. В ходе исследования выявлена взаимосвязь между составом первичных и вторичных метаболитов в лекарственном растительном сырье.

Ключевые слова: сабельник болотный, надземная часть, подземная часть, первичные метаболиты, метаболомный анализ

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

Вклад авторов. М. Н. Повыдыш и А. А. Орлова придумали и разработали эксперимент. А. А. Орлова и Й. Стругар провели экспериментальную работу и статистическую обработку результатов. А. А. Орлова, Й. Стругар, М. Н. Повыдыш участвовали в обсуждении результатов исследования, подготовке текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена при методологической поддержке кафедры физиологии и биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России. Работа выполнена при методологической поддержке кафедры физиологии и биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета.

Для цитирования: Стругар Й., Орлова А. А., Повыдыш М. Н. Сравнительный ГХ-МС анализ состава метаболитов надземной и подземной части сабельника болотного (*Comarum palustre* L.). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4–1):95–103. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-95-103](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-95-103)

Comparative GC-MS Analysis of the Composition of Metabolites of Aboveground and Underground Parts of *Comarum palustre* L.

Jovana Strugar, Anastasia A. Orlova*, Maria N. Povydysh

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Anastasia A. Orlova. E-mail: anastasiya.lebedkova@spcpu.ru

ORCID: Jovana Strugar – <https://orcid.org/0000-0002-0816-2579>; Anastasia A. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-7836-578>; Maria N. Povydysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-905>.

Received: 20.10.2021

Revised: 23.11.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Understanding the mechanisms of accumulation of individual groups of biologically active substances in promising types of plant raw materials and the possibility of predicting them is important for solving fundamental and applied problems of pharmaceuticals. To date, differences have been revealed in the qualitative and quantitative composition of secondary metabolites in the aboveground and underground of *Comarum palustre* L., however, the issue remains unstudied.

Aim. Comparative metabolomic study of the composition of the primary metabolites of the aboveground and underground parts of *Comarum palustre* L.

Materials and methods. The object of the study was the aboveground and underground parts of *Comarum palustre* L., harvested in the vicinity of the nursery of medicinal plants of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (Leningrad Region, Vsevolozhsky District, Priozerskoe Highway, 38 km) in 2019 and dried. Metabolomic studies based on GC-MS method was performed. A statistical analysis based on the MetaboAnalyst 5.0 platform was used.

Results and discussion. Analysis of the chromatograms obtained using the GC-MS method revealed the content of 933 primary metabolites in the aboveground and underground parts of *Comarum palustre* L., 120 of which were identified. Using a number of statistical methods, 10 metabolites from monosaccharides, acids and alcohols, making the greatest contribution to the manifestation of differences between the studied samples, were identified.

Conclusion. The study revealed the relationship between the composition of primary and secondary metabolites in medicinal plant raw materials.

Keywords: *Comarum palustre* L., aerial part, underground part, primary metabolites, metabolomic analysis

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 N. Povydysh, Anastasia A. Orlova – conceptualization, methodology. Anastasia A. Orlova, Jovana Strugar – experimental work and statistical processing of the results. Anastasia A. Orlova, Jovana Strugar, Maria N. Povydysh – discussion of research results, preparation of the text of the article.

Acknowledgment. This work was carried out with the methodological support of the Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SPKhFU of the Ministry of Health of Russia" in the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia. This work was carried out with the methodological support of the Department of Plant Physiology and Biochemistry, St. Petersburg State University.

For citation: Strugar J., Orlova A. A., Povydysh M. N. Comparative GC-MS analysis of the composition of metabolites of aboveground and underground parts of *Comarum palustre* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):95-103. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-95-103](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-95-103)

ВВЕДЕНИЕ

Создание активных фармацевтических субстанций на основе индивидуальных низкомолекулярных веществ природного происхождения и лекарственных препаратов на их основе является актуальным направлением в силу их широкого фармакологического потенциала, сравнительно более высокой безопасности и низкой токсичности [1, 2]. Именно поэтому важной задачей является всестороннее изучение метаболитного состава растительных объектов, разработка подходов к выделению индивидуальных компонентов и оценка их фармакологического потенциала [3].

Сабельник болотный (*Comarum palustre* L.) – травянистое растение из семейства розовых (*Rosaceae*), произрастающее в северном полушарии [4]. Вид находит широкое применение в традиционной медицине в качестве противовоспалительного, вяжущего, противовирусного анальгезирующего [5], а также показывает впечатляющие данные на экспериментальных моделях гипогликемического, нефропротекторного, противовирусного, антиоксидантного и других фармакологических эффектов [6–8]. Кроме того, проведены многочисленные исследования состава биологически активных соединений. На сегодняшний день в литературе описано порядка 70 компонентов из групп полифенолов, тритерпеноидов, стероидов, полисахаридов и других, а также показаны значимые различия в качественном и количественном составе метаболитов при сравнении надземной и подземной части сабельника болотного.

Понимание механизмов накопления отдельных групп биологически активных веществ в перспективных видах сырья и возможности их прогнозирования

важно для решения фундаментальных и прикладных задач фармацевтики [9]. Для решения данных вопросов удобным инструментом являются метаболомные подходы. Использование различных протоколов исследования позволяет оценить состав первичных метаболитов и спрогнозировать основные биосинтетические пути в клетках, а также оценить зависимость накопления биологически активных веществ (БАВ) от влияния внешних и внутренних факторов, изыскать пути управления накоплением целевых групп БАВ и оценить целесообразность работы с тем или иным видом растительного материала [10].

Именно поэтому **целью данного исследования** являлось сравнительное метаболомное изучение состава первичных метаболитов надземной и подземной части сабельника болотного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали надземную и подземную части сабельника болотного, заготовленные в окрестностях питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в 2019 году и высушенные воздушно-теневым методом.

Растительный материал экстрагировали водным раствором метанола. Полученные извлечения были последовательно дериватизированы О-метилгидроксиламин гидрохлоридом и N-метил-N-(trimetilsilyl)-трифторацетамидом [11]. Анализ проводили методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS-QP2010 (SHIMADZU) с квадрупольным анализатором,

с использованием ионизации методом электронного удара и 5%-фенил-95%-диметилсилоксановой колонки (DB-5 MS UI, J&W Fisher, Германия). Экстракция и аннотация пиков проводилась с использованием программного обеспечения AMDIS, Xcalibur 3.0 и MSDIAL, идентификация соединений основывалась на индексах времен удерживания и схожести спектров ионизации в потоке электронов (NIST14 и собственные спектральные библиотеки). Количественный анализ основывался на интеграции соответствующих масс-хроматограмм (extracted ion chromatograms, XICs, ± 0.5 Da) при соответствующих временах удерживания (Rt).

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программном обеспечении MetaboAnalyst 5.0 с использованием одномерных и многомерных методов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В данном исследовании была проведена оценка метаболических профилей надземной и подземной части сабельника болотного. В ходе анализа полученных хроматограмм было выявлено 933 первичных метаболита, 120 из которых удалось идентифицировать с использованием коммерческих и собственных библиотек. Полная информация об идентифицированных метаболитах представлены в таблице 1.

Таблица 1. Первичные метаболиты, идентифицированные в ходе сравнительного метаболомного исследования надземной и подземной частей сабельника болотного

Table 1. Primary metabolites identified in the comparative metabolomic study of the aboveground and underground parts of *C. palustre*

Название метаболита Metabolite name	Время удерживания, Rt, мин Retention time Rt, min	Индекс удерживания, RI Retention index RI
<i>Карбоновые кислоты</i> <i>Carboxylic acids</i>		
Пироглутаминовая кислота Pyroglutamic acid	13.156	1167.3
Эритроновая кислота Erythronic acid	19.747	1531.8
Пальмитиновая кислота Palmitic acid	28.817	2048.9
Галактаровая кислота Galactaric acid	28.935	2056.5
Кофеиновая кислота Caffeic acid	30.386	2152.5
Малоновая кислота Malonic acid	13.615	1201.2
Никотиновая кислота Nicotinic acid	14.819	1300.3

Название метаболита Metabolite name	Время удерживания, Rt, мин Retention time Rt, min	Индекс удерживания, RI Retention index RI
Малеиновая кислота Maleic acid	15.162	1315.9
Янтарная кислота Succinic acid	15.210	1318.0
Метил-янтарная кислота Methyl succinic acid	15.381	1325.7
Глицериновая кислота Glyceric acid	15.845	1353.1
Фумаровая кислота Fumaric acid	16.041	1353.6
Пеларгоновая кислота Pelargonic acid	16.290	1366.6
Глутаровая кислота Glutaric acid	16.733	1386.6
Мезаконовая кислота Mesaconic acid	18.427	1466.8
Цитрамаловая кислота Citrimalic acid	18.859	1487.5
Яблочная кислота Malic acid	19.211	1504.6
L-аспаргиновая кислота L-aspartic acid	19.330	1510.6
Ацетилсалicyловая кислота Acetylsalicylic acid	19.531	1520.9
4-аминобутировая кислота 4-aminobutyric acid	19.930	1541.1
Гамма-аминомасляная кислота Gamma-aminobutyric acid	19.956	1542.4
6-гидрокси-никотиновая кислота 6-hydroxy-nicotinic acid	20.222	1556.9
Треоновая кислота Threonic acid	20.450	1567.5
3-гидрокси-бензоат 3-hydroxy benzoate	20.592	1574.7
3-изопропил-малоновая кислота 3-isopropyl malonic acid	20.969	1593.6
3-гидрокси-3-метил-глутарат 3-hydroxy-3-methyl-glutarate	21.424	1617.9
Винная кислота Tartaric acid	21.535	1623.8
4-гидроксибензойная кислота 4-hydroxybenzoic acid	21.609	1627.8
Пипеколиновая кислота Pipelicolic acid	21.882	1642.4
β -кетоадипиновая кислота β -keto adipic acid	22.060	1651.9
Лауриновая кислота Lauric acid	22.148	1656.6
Ксилоновая кислота Xylic acid	23.614	1736.7

Название метаболита Metabolite name	Время удерживания, Rt, мин Retention time Rt, min	Индекс удерживания, RI Retention index RI
1,3-бензендикарбоновая кислота 1,3-benzenedicarboxylic acid	24.157	1767.6
Ванилиновая кислота Vanillic acid	24.307	1775.7
Шикимовая кислота Shikimic acid	25.307	1833.38
3,4-дигидроксибензоат 3,4-hydroxybenzoate	25.364	1836.7
Лимонная и изолимонная кислоты Citric and Isocitric acids	25.537	1846.9
Лимонная кислота Citric acid	20.56	1848.2
Миристиновая кислота Myristic acid	25.627	1852.2
N-карбамил-глутамат N-carbamyl glutamate	26.278	1890.5
Хинная кислота Quinic acid	26.362	1895.4
п-кумаровая кислота p-coumaric acid	27.248	1950.3
Галловая кислота Gallic acid	27.768	1982.0
Галактуроновая кислота Galacturonic acid	27.813	1984.7
Изогексоновая кислота Isohexonic acid	28.169	2007.0
Глюконовая кислота Gluconic acid	28.753	2044.7
Сахарная кислота Saccharic acid	28.989	2059.9
Феруловая кислота Ferulic acid	29.672	2104.2
Гептадекановая кислота Heptadecanoic acid	30.341	2149.4
Стеариновая кислота Stearic acid	31.506	2229.1
Синапиновая кислота Sinapic acid	31.924	2258.3
Изохлорогеновая кислота Isochlorogenic acid	41.766	2978.7
Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid	43.054	3079.2
<i>Моносахариды</i> <i>Monosaccharides</i>		
Арабиноза Arabinose	22.537	1677.4
Фукоза Fucose	23.822	1748.5

Название метаболита Metabolite name	Время удерживания, Rt, мин Retention time Rt, min	Индекс удерживания, RI Retention index RI
Глюкоза Glucose	27.086	1939.9
Изомальтоза Isomaltose	39.48	2850.5
D-(-)-рибоза D-(-)-ribose	21.986	1647.9
Ксилоза Xylose	22.544	1677.7
Ликсоза Lyxose	22.726	1687.5
Рибоза Ribose	22.812	1692.1
Рамноза Rhamnose	23.842	1749.6
2-дезокси-D-глюкоза 2-deoxy-D-glucose	24.281	1774.2
β -D-(+)-глюкоза 2-deoxy-D-glucose	26.136	1882.2
Аллоза Allose	27.100	1940.7
Фруктоза-6-фосфат Fructose-6-phosphate	33.596	2378.5
D-(+)-мальтоза D-(+)-maltose	36.092	2568.6
D-(+)-тrehalose	36.374	2590.9
β -лактоза β -lactose	37.127	2651.8
α -лактоза α -lactose	37.158	2654.3
Мелибиоза Melibiose	38.358	2754.1
Мальтотриоза Maltotriose	54.592	3333.8
D-(+)-мелецитоза D-(+)-melecytosis	46.816	3453.4
Рафиноза Raffinose	47.267	3495.1
D-паноза D-panose	48.846	3620.8
<i>Спирты</i> <i>Alcohols</i>		
Мио-инозитол Myo-inositol	29.119	2086.3
Этаноламин Ethanolamine	14.293	1255.8
Глицерол Glycerol	14.298	1256.3

Название метаболита Metabolite name	Время удерживания, Rt, мин Retention time Rt, min	Индекс удерживания, RI Retention index RI
R-(-)-1-амино-2-пропанол R-(-)-1-amino-2-propanol	15.194	1317.3
Мезоэрритритол Mesoerythritol	19.724	1530.6
L-(-)-арабитол L-(-)-arabitol	21.801	1638.1
Рибитол, 1 TMS Ribitol, 1 TMS	23.120	1708.9
Ксилитол Xylitol	23.466	1728.5
Рибитол, 5 TMS Ribitol, 5 TMS	24.006	1758.8
1,2-ангиdro-мио-инозитол 1,2-anhydro-myo-inositol	25.889	1867.6
L-идитол L-iditol	26.263	1889.5
Маннитол Mannitol	27.596	1971.4
Сорбитол Sorbitol	27.762	1981.1
Кондуритол- β -эксиксайд Conduritol- β -expoxide	27.972	1994.6
Фитол Phytol	30.867	2184.9
Глицерол-3-галактозид Glycerol-3-galactoside	32.199	2277.5
Гликозид салицилового спирта Salicylic alcohol glycoside	36.051	2565.4
Мальтитол Maltitol	39.182	2824.5
Аминокислоты Amino acids		
L-серин L-serine	14.200	1247.8
Изолейцин Isoleucine	14.941	1305.9
Тreonин, 2TMS Threonine, 2TMS	14.984	1307.8
Урацил Uracil	15.989	1353.1
β -цианоаланин β -cyanoalanine	16.662	1383.4
Тreonин, 3 TMS Threonine, 3 TMS	17.073	1402.1
β -аланин β -alanine	17.822	1437.9
Оксопролин β -alanine	19.763	1532.6

Название метаболита Metabolite name	Время удерживания, Rt, мин Retention time Rt, min	Индекс удерживания, RI Retention index RI
Аденин Adenine	26.084	1879.1
Тирозин Adenine	27.420	1960.5
L-триптофан L-tryptophan	31.445	2224.8
Аденозин Adenosine	37.371	2671.6
Изопентиладенозин Isopentyladenosine	41.330	2958.7
Жирные кислоты Fatty acids		
Линолевая кислота Linoleic acid	31.336	2217.2
Олеиновая кислота Oleic acid	31.412	2222.5
Линоленовая кислота Linolenic acid	31.431	2223.9
Арахиновая кислота Arachidic acid	34.507	2441.5
Углеводороды Hydrocarbons		
Тридекан Tridekan	19.956	1542.4
3-этил-2,6,10- trimethyl-ундекан 3-ethyl-2,6,10-trimethyl-undecane	20.687	1579.1
Пентадекан Pentadecane	23.298	1718.9
Аминосахара Amino sugar		
D-(+)-галактозамин D-(+)-galactosamine	26.684	1915.1
Уридин-5'-дифосфо-N-ацетил- глюкозамин Uridine-5'-diphospho-N-acetyl- glucosamine	24.996	1815.4
N-ацетил-D-глюкозамин N-acetyl-D-glucosamine	28.962	2058.2
Хиноны Quinones		
Гидрохинон Hydroquinone	17.260	1410.9
Альдегид Aldehyde		
п-гидроксибензальдегид p-hydroxybenzaldehyde	19.061	1497.2
Катехины Catechins		
Эпикатехин Epicatechin	40.083	2901.5

Для получения достоверной и полной оценки различий метаболических профилей объектов исследования данные обрабатывали с использованием ряда статистических методов. Нормализованные данные относительных содержаний хроматографических сигналов были импортированы в программное обеспечение MetaboAnalyst 5.0.

С использованием методов кластерного анализа показано образование четко обособленных кластеров между образцами надземной и подземной части, а также наличие корреляции между всеми анализируемыми образцами в каждой из групп (рисунок 1).

Для выявления различий в клеточном метаболизме надземной и подземной части сабельника болотного мы сосредоточились на сравнительном анализе 120 идентифицированных метаболитов. Кластерный анализ по идентифицированным соединениям показал схожие результаты с анализом по всем выявленным компонентам (рисунок 2).

Средние уровни 120 метаболитов в исследуемых образцах были соответственно рассчитаны и сопоставлены. Значения этих метаболитов были выра-

женены с использованием критерия Стьюдента (значение менее 0,05 считалось значимым), исходя из чего выявлено, что 111 из рассматриваемых метаболитов имеют значимые количественные различия, из них количество 87 метаболитов в подземной части сабельника болотного снижается в сравнении с подземной части, а 26 – увеличивается (рисунок 3).

Кроме того, был выполнен анализ главной компоненты для разработки визуального графика оценки сходства и различия метаболических профилей. Так, PCA показал расхождение обособленных кластеров образцов надземной и подземной части сабельника болотного в двух основных компонентах PC1 и PC2, на которых приходится 51.1 и 20.8 % дисперсии данных, соответственно, что позволяет сделать заключение о значимых различиях их метаболических профилей (рисунок 4, А). Чтобы сделать это различие более очевидным, был выполнен контролируемый анализ PLS-DA с масштабированным по Парето набором данных и преобразованием мощности с использованием первых двух скрытых переменных. На данной модели получены аналогичные с PCA резуль-

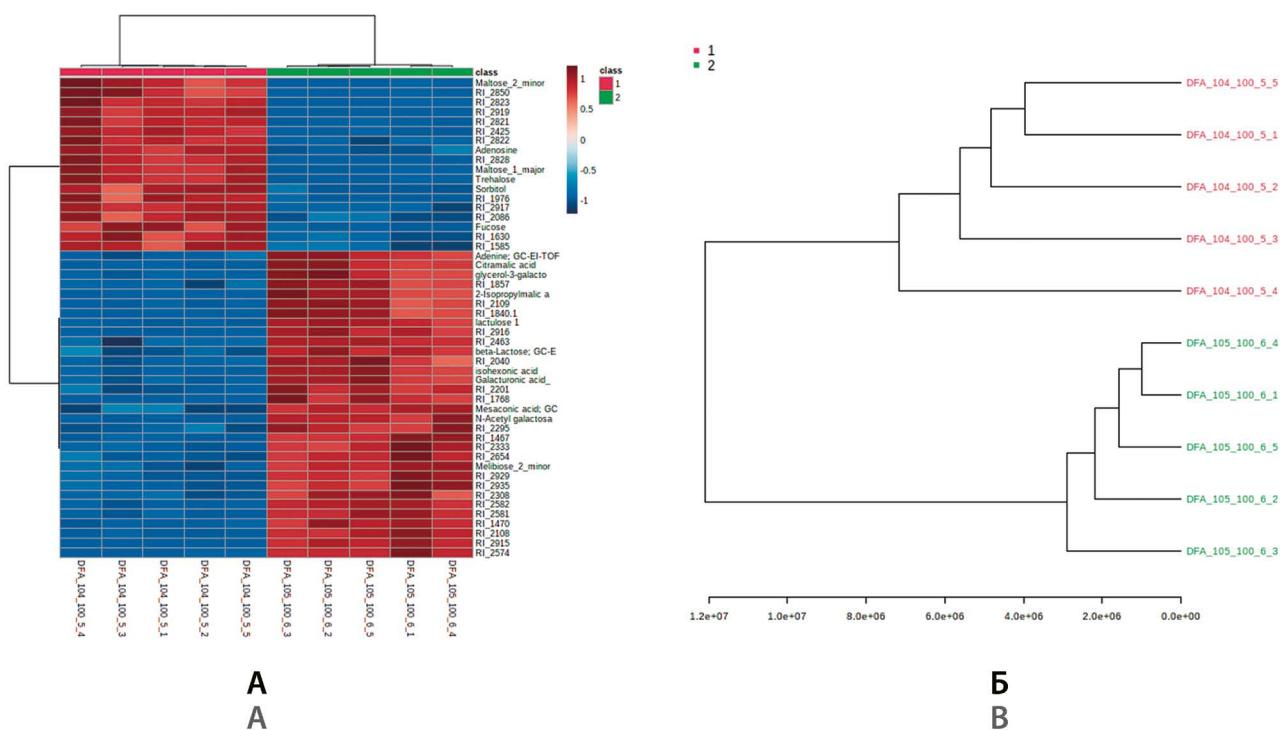


Рисунок 1. Иерархический кластерный анализ образцов:

А – тепловая карта TOP50 метаболитов; Б – дендрограмма. Интенсивность цвета отражает нормализованные значения относительного содержания компонента в исследуемом образце; красный цвет представляет повышение относительного содержания, синий – понижение; группа 1 – образцы подземной части сабельника болотного; группа 2 – образцы надземной части сабельника болотного

Figure 1. Hierarchical cluster analysis of samples:

A. heat map of TOP50 metabolites; B – dendrogram. The intensity of the color reflects the normalized values of the relative content of the component in the test sample; red – up-regulated compounds, blue – down-regulated; group 1 – samples of the underground part of *C. palustre*; group 2 – samples of the aboveground part of *C. palustre*

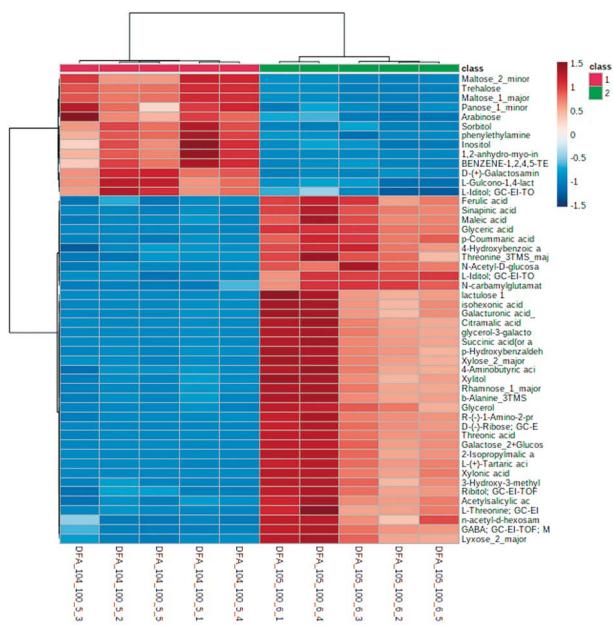


Рисунок 2. Иерархический кластерный анализ (тепловая карта) образцов на основании TOP50 идентифицированных метаболитов. Интенсивность цвета отражает нормализованные значения относительного содержания компонента в исследуемом образце; красный цвет представляет повышение относительного содержания, синий – понижение; группа 1 – образцы подземной части сабельника болотного; группа 2 – образцы надземной части сабельника болотного

Figure 2. Hierarchical cluster analysis (heat map) of samples based on TOP50 identified metabolites. The intensity of the color reflects the normalized values of the relative content of the component in the test sample; red – up-regulated compounds, blue – down-regulated; group 1 – samples of the underground part of *C. palustre*; group 2 – samples of the aboveground part of *C. palustre*

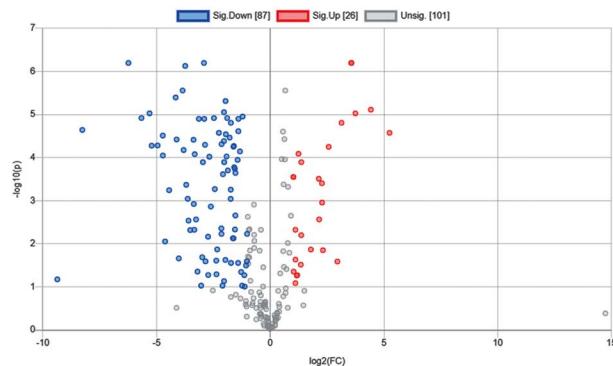


Рисунок 3. График вулкана комбинированного анализа кратных изменений и критерия Стьюдента. Пороговая кратность изменчивости равна 2.0, пороговое значение p равно 0.05. Направление сравнения 1-2. Синим обозначаются соединения, количество которых снижается в первой группе по отношению ко второй, красным – увеличивается

Figure 3. Volcano plot. The threshold multiplicity of variability is 2.0, the threshold p value is 0.05. Comparison direction 1-2. Red – up-regulated compounds, blue – down-regulated

таты (рисунок 4, Б). В соответствии с графиками нагрузки PLS-DA (рисунки 5, 6) было выявлено 10 маркерных метаболитов (при $VIP > 1$), наиболее значимых для кластеризации групп в модели PLS-DA, среди них сигналы трех карбоновых кислот – кофейной, эритрновой и галактаровой, шестиатомного спирта циклогексана – мио-инозитола, и шести моносахаридов – арабинозы, изомальтозы, эрлозы, фукозы, лейкозы и глюкозы.

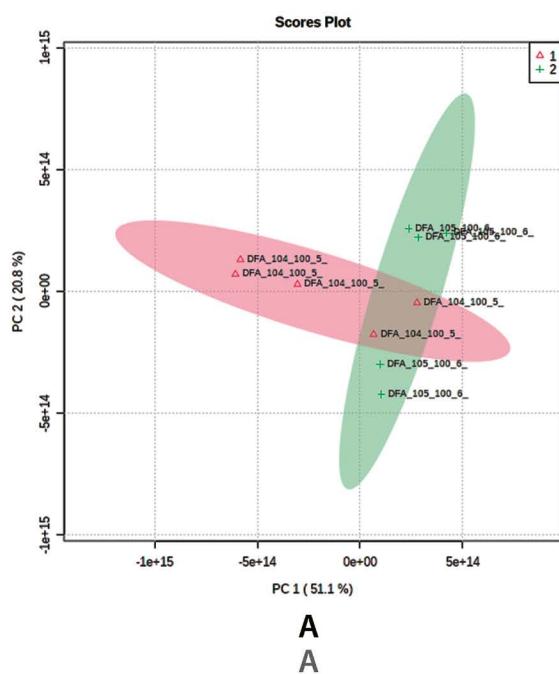
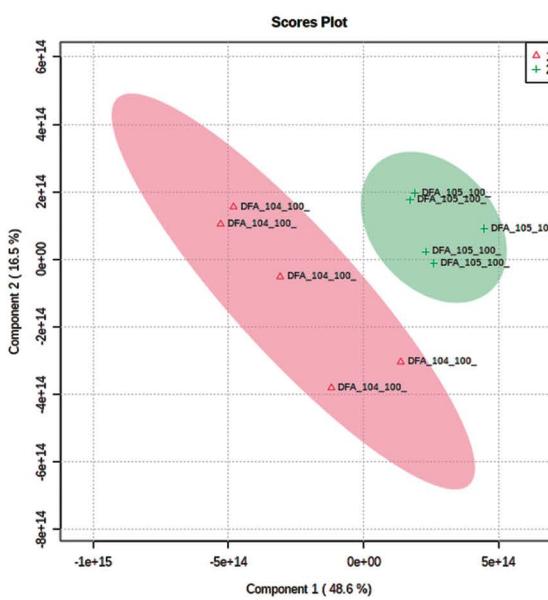


Рисунок 4. Графики оценки PCA (А) и PLS-DA (Б)

Figure 4. PCA (A) and PLS-DA (B) score plots



Б

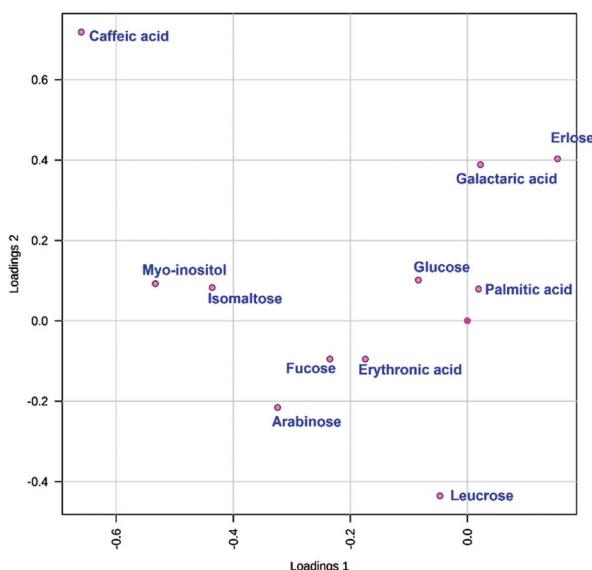


Рисунок 5. График нагрузки PLS-DA с указанием метаболитов, вносящих наибольший вклад в кластеризацию исследуемых образцов, соответствующие графикам оценки (рисунок 4, Б)

Figure 5. PLS-DA loading plot showing metabolites that make the greatest contribution to the clustering of the studied samples, corresponding to the assessment graphs (Figure 4, B)

Увеличение количества маркерных первичных метаболитов в клетках надземной части сабельника болотного сигнализирует об интенсификации синтеза вторичных метаболитов по фенилпропаноидному и шикиматному путям, что закономерно приводит к

повышению содержания вторичных метаболитов полифенольной природы, таких как флавоноидов, танинов и фенолкарбоновых кислот. Исходя из чего, именно надземная часть сабельника болотного может являться более перспективным источником очищенных сумм полифенольных соединений и индивидуальных низкомолекулярных метаболитов данной группы для разработки на их основе активных фармацевтических субстанций, биологически активных добавок и продуктов функционального питания или лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования были выявлены маркерные метаболиты вносящие наибольший вклад в различия в качественном и количественном составе вторичных метаболитов в надземной и подземной части сабельника болотного. Показано, что метаболомный подход является мощным инструментом выявления механизмов накопления БАВ в растительных клетках и анализа целесообразности использования конкретного вида растительного материала в качестве источника целевых метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karimi A., Maedeh M., Rafieian-Kopaei M. Herbal versus synthetic drugs: beliefs and facts. *Journal of nephropharmacology*. 2015;4(1):27–30.
2. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Onoporus arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago*

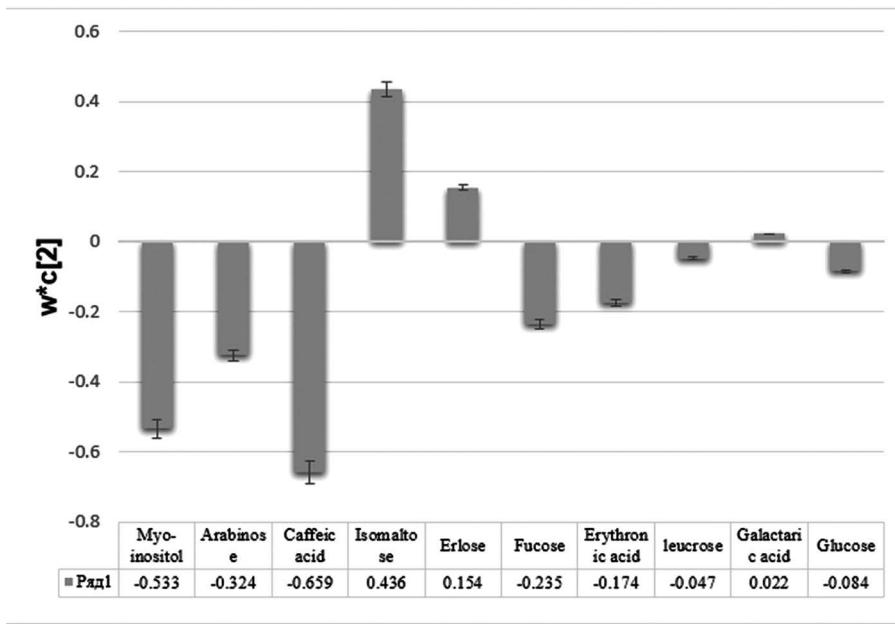


Рисунок 6. График нагрузки модели PLS-DA (рисунок 5), наблюдаемый для РС 2 ($w^*c[2]$). Каждый столбец представляет собой выявленный метаболит со стандартными ошибками, отображаемыми на панели ошибок

Figure 6. Loading column plot of the PLS-DA model (figure 5), observed by PC 2 ($w^*c[2]$). Each column represents an identified metabolite with standard errors displayed in the error bar

- canadensis* L.). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
- 3. Moilanen J., Sinkkonen J., Salminen J. P. Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. *Chemoecology*. 2013;23:165–179. DOI: 10.1007/s00049-013-0132-3.
 - 4. Ajebli M., Eddouks M. The promising role of plant tannins as bioactive antidiabetic agents. *Current Medical Chemistry*. 2019;26(25):4852–4884. DOI: 10.2174/0929867325666180605124256.
 - 5. Sergun V., Burkova V., Poznyakovsky V., Tokhiriyan B. Siberian plants and natural mineral salts for dietary supplements. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*. 2021;10(2):108–115. DOI: 10.51847/ChW0Q2S4ev.
 - 6. Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Olennikov D. N. Agrimonin, an active ellagitannin from *Comarum palustre* herb with anti- α -glucosidase and antidiabetic potential in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules*. 2017;22(1):1–16. DOI: 10.3390/molecules22010073.
 - 7. Hellén H., Schallhart S., Praplan A. P., Tykkä T., Aurela M., Lohila A., Hakola H. Sesquiterpenes dominate monoterpenes in northern wetland emissions. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2020;20(11):7021–7034. DOI: 10.5194/acp-20-7021-2020.
 - 8. Orlova A. A., Strugar J., Shtark O. Yu., Zhukov V. A., Luzhanin V. G., Povydysh M. N. Use of Metabolomic Approaches in Analysis of Medicinal Plants and Phytopreparations (Review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):97–105. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105.
 - 9. Stržincová P., Ház A., Burčová Z., Feranc J., Kreps F., Ňurina I., Jablonský M. Spruce bark—a source of polyphenolic compounds: Optimizing the operating conditions of supercritical carbon dioxide extraction. *Molecules*. 2019; 24(22):1–15. DOI: 10.3390/molecules24224049.
 - 10. Milkovska-Stamenova S., Schmidt R., Frolov A., Birkemeyer C. GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63:5911–5919. DOI: 10.1021/jf505757m.
 - 11. Rosli M. A. F., Medianı A., Azızan K. A., Baharum S. N., Goh H.-H. UPLC-TOF-MS/MS-Based metabolomics analysis reveals species-specific metabolite compositions in pitchers of *Nepenthes ampullaria*, *Nepenthes rafflesiana* and their hybrid *Nepenthes* *hookeriana*. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:655004. DOI: 10.3389/fpls.2021.655004.

REFERENCES

- 1. Karimi A., Maedeh M., Rafieian-Kopaei M. Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of nephropharmacology*. 2015;4(1):27–30.
- 2. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of Individual Compounds from the Terrestrial Parts of *Ononis Arvensis* L. and *Solidago Canadensis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):83–89. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
- 3. Moilanen J., Sinkkonen J., Salminen J. P. Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. *Chemoecology*. 2013;23:165–179. DOI: 10.1007/s00049-013-0132-3.
- 4. Ajebli M., Eddouks M. The promising role of plant tannins as bioactive antidiabetic agents. *Current Medical Chemistry*. 2019;26(25):4852–4884. DOI: 10.2174/0929867325666180605124256.
- 5. Sergun V., Burkova V., Poznyakovsky V., Tokhiriyan B. Siberian plants and natural mineral salts for dietary supplements. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*. 2021;10(2):108–115. DOI: 10.51847/ChW0Q2S4ev.
- 6. Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Olennikov D. N. Agrimonin, an active ellagitannin from *Comarum palustre* herb with anti- α -glucosidase and antidiabetic potential in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules*. 2017;22(1):1–16. DOI: 10.3390/molecules22010073.

Определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного травы

М. В. Ароян*, Ю. Э. Генералова, И. И. Тернинко, И. Е. Каухова, Е. К. Новикова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Ароян Мария Вахтанговна. E-mail: mariya.aryan@pharminnotech.com

ORCID: М. В. Ароян – <https://orcid.org/0000-0002-8314-8398>; Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
И. Е. Каухова – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>; Е. К. Новикова – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 01.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Субстанции растительного происхождения проявляют разнообразную фармакологическую активность в сочетании с относительно низкой токсичностью и частотой проявления побочных эффектов. В связи с этим, перспективным направлением является стандартизации субстанций растительного происхождения в процессе разработки новых растительных препаратов.

Цель. Качественное и количественное определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использовали субстанцию – сухой экстракт донника лекарственного травы. Определение индивидуального кумарина проводили методом высокоеффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований на основании сопоставления времен удерживания пробы с временем удерживания стандартного образца кумарина в исследуемом образце сухого экстракта методом высокоеффективной жидкостной хроматографии был идентифицирован кумарин. Содержание кумарина в сухом экстракте составило $0,642 \pm 0,007\%$.

Заключение. Полученные данные о качественном и количественном содержании кумарина в сухом экстракте донника лекарственного были использованы в разработке проекта спецификации показателей качества.

Ключевые слова: донник лекарственный, сухой экстракт, кумарин, высокоеффективная жидкостная хроматография, качественный анализ, количественный анализ

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

Вклад авторов. И. Е. Каухова, М. В. Ароян, Е. К. Новикова предложили технологию получения сухого экстракта из донника лекарственного травы. И. И. Тернинко, Ю. Э. Генералова качественно обнаружили и количественно определили индивидуальный кумарин в сухом экстракте донника лекарственного. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Ароян М. В., Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Каухова И. Е., Новикова Е. К. Определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):104–107. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-104-107](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-104-107)

Determination of Individual Coumarin in a Dry Extract of *Melilotus Officinalis* L.

Mariya V. Aroyan*, Yuliya E. Generalova, Inna I. Terninko, Irina E. Kaukhova,
Ekaterina K. Novikova

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Mariya V. Aroyan. E-mail: mariya.aryan@pharminnotech.com

ORCID: Mariya V. Aroyan – <https://orcid.org/0000-0002-8314-8398>; Yuliya E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
Irina E. Kaukhova – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>; Ekaterina K. Novikova – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>.

Received: 20.10.2021

Revised: 01.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Substances of plant origin exhibit a variety of pharmacological activity in combination with a relatively low toxicity and frequency of side effects. In this regard, a promising direction is the standardization of substances of plant origin in the development of new herbal medicinal products.

Aim. Qualitative and quantitative determination of individual coumarin in a dry extract of *Melilotus officinalis* L.

Materials and methods. A dry extract of the *Melilotus officinalis* L. was used as an object of research. Determination of individual coumarin was carried out by high-performance liquid chromatography.

Results and discussion. As a result of the research, coumarin was identified by high performance liquid chromatography based on comparison of retention times of the sample with retention times of a standard sample of coumarin in the sample of dry extract under research. The coumarin contents in the dry extract was $0.642 \pm 0.007\%$.

Conclusion. The data obtained on the qualitative and quantitative content of coumarin in the dry extract of *Melilotus officinalis* L. were used in the development of the draft version specification of quality indicators.

Keywords: *Melilotus officinalis* L., dry extract, coumarin, high performance liquid chromatography, qualitative analysis, quantitative analysis

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. Irina E. Kaukhova, Mariya V. Aroyan, Ekaterina K. Novikova proposed a technology for obtaining a dry extract from the herb *Melilotus Officinalis* L. Inna I. Terninko and Yuliya E. Generalova qualitatively detected and quantified individual coumarin in the dry extract of *Melilotus officinalis* L. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Aroyan M. V., Generalova Yu. E., Terninko I. I., Kaukhova I. E., Novikova E. K. Determination of individual coumarin in a dry extract of *Melilotus officinalis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):104–107. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-104-107](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-104-107)

ВВЕДЕНИЕ

Зарубежный и отечественный фармацевтический рынок характеризуется тенденцией к увеличению потребительского интереса к лекарственным средствам растительного происхождения. Расширение сырьевой базы лекарственных растений объясняется относительно низкой частотой побочных явлений и возможностью длительного приема лекарственных растительных препаратов [1–3]. В связи с чем, особое внимание следует уделять изучению химического состава лекарственных растений, стандартизации лекарственных субстанций растительного происхождения, разработке эффективных технологий получения лекарственных препаратов на их основе [4–7]. Среди лекарственного растительного сырья (ЛРС) перспективным объектом изучения является донник лекарственный.

Донника лекарственного трава впервые включена в Государственную Фармакопею 13 издания. При качественном анализе донника лекарственного травы были выявлены кумарины, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, сапонины, полифенолы. В предварительных фармакологических исследованиях у извлечений из травы донника лекарственного были установлены обезболивающий, противовоспалительный, капилляроукрепляющий эффекты. Однако до настоящего времени на фармацевтическом рынке практически отсутствуют лекарственные средства на основе экстрактов из донника лекарственного [8–10].

Цель работы. Качественное и количественное определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Стандартный образец (СО) кумарина (CAS 91-64-5, ≥98 %), спирт (ГОСТ Р 51652-2000), вода очищенная (ФС.2.2.0020.15 «Вода очищенная»), ацетонитрил для высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (gradient grade, ≥99,9 %), кислота ортофосфорная 85 % (ГОСТ 6552-58).

Объектом исследования являлась субстанция – сухой экстракт донника лекарственного, представляющий собой порошок темно-коричневого цвета, с характерным запахом, горького вкуса.

Методы. Качественное и количественное определение кумарина проводили методом ВЭЖХ (Shimadzu LC-20, SPD-M20A, снабженным диодно-матричным детектором.

Хроматографические условия: колонка Intersil ODS3, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США); подвижная фаза 0,1 % кислота ортофосфорная/ацетонитрил в соотношении 75/25; скорость потока 1 мл/мин; объем пробы 20 мкл; температура колонки 40 °C; длина волн 275 нм.

Приготовление стандартного раствора кумарина: раствор готовили путем растворения кумарина в 96 % этиловом спирте. Точную навеску СО кумарина помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки 96 % этиловым спиртом. Растворы перемешивали. Получали растворы с содержанием стандартного вещества 9,5 мг (исходный раствор). Стандартный раствор готовили непосредственно перед анализом путем разбавления исходных растворов водой очищенной до концентраций 0,0095 мг/мл.

Подготовка пробы испытуемого образца. Точную навеску сухого экстракта донника лекарственного травы помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 1 мл этилового спирта 96 %, доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали и фильтровали. Все растворы фильтровали через мембранный фильтр Nylon с диаметром пор 0,45 мкм (Perkin Elmer, США) и записывали хроматограммы.

Количественное обнаружение кумарина проводили методом внешнего стандарта. Подготовку раствора СО кумарина и пробы испытуемого образца проводили по методики, описанной выше.

Содержание кумарина в сухом экстракте пересчитали на стандарт в процентах (Х) вычисляли по формуле 1:

$$X = \frac{C_{ct} S_x P 100}{C_o S_{ct} (100 - W)},$$

где C_{ct} и C_o – концентрация стандарта и испытуемого вещества, г/мл; S_{ct} – площадь пика стандарта, мВ/с; S_x – площадь пика вещества в сухом экстракте, мВ/с; P – содержание вещества в стандартном образце, %; W – потеря в массе при высушивании сухого экстракта, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения сухого экстракта донника лекарственного травы, содержащего кумарин, навеску лекарственного растительного сырья, измельченного на электро траво- и корнерезке (ТУ 37-53 тип 622-1-М, Россия) до размера частиц 0,5–1,0 мм, загружали в емкость, заливали экстрагентом – этиловый спирт 65 % в соотношении сырье–экстрагент 1:20. Экстрагирование осуществляли методом мацерации в ультразвуковой бане (ПСБ-2835-05 ПСБ-Галс, Россия) при температуре 75 °C, время экстрагирования – 25 минут. Полученное извлечение отстаивали при температуре не выше 8 °C в течение 2 суток, отфильтровывали. Сушку экстракта проводили в сушильном шкафу (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) при температуре 55–60 °C до остаточного влагосодержания в экстракте не более 5 %. Сухой экстракт измельчали и просеивали через сито 1,0 мм [11].

На рисунке 1 представлена хроматограмма стандартного образца кумарина.

Результаты хроматографического исследования пробы испытуемого образца представлены на рисунке 2.

Идентификацию кумарина проводили путем со-поставления времен удерживания пика, полученного на хроматограмме пробы с временем удерживания стандартного образца кумарина, а также спектров поглощения соответствующих пиков (рисунок 3).

Время удерживания пика стандартного образца кумарина составляло 19,39 мин, на хроматограмме исследуемого образца сухого экстракта наблюдается

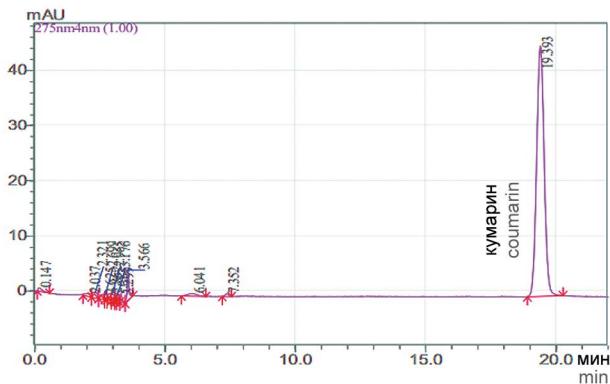


Рисунок 1. Хроматограмма СО кумарина

Figure 1. Chromatogram of coumarin

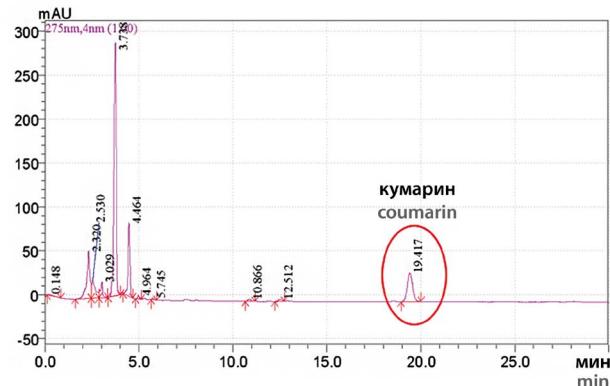


Рисунок 2. Хроматограмма ВЭЖХ сухого экстракта донника лекарственного

Figure 2. HPLC chromatogram of a dry extract of *Melilotus officinalis* L.

пик с временем удерживания 19,42 мин, относительная погрешность времен составляет 0,2 %, что позволяет идентифицировать пик как кумарин. Спектры, полученные для указанных пиков, совпадают по положению максимумов поглощения, что подтверждает идентификацию пика, как кумарин.

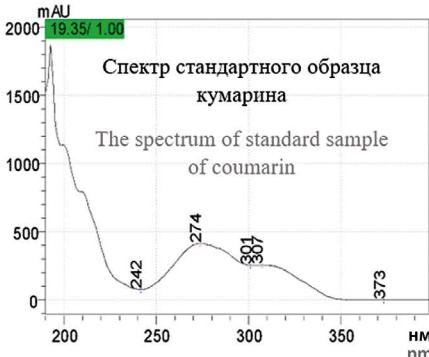
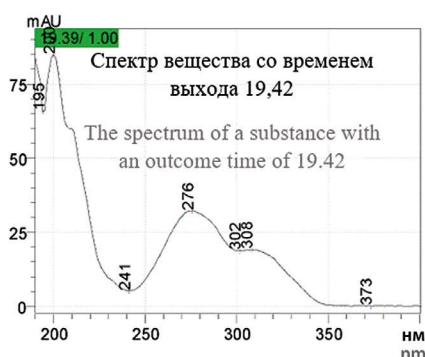


Рисунок 3. Спектр СО кумарина и сухого экстракта донника лекарственного

Figure 3. Spectrum of coumarin and dry extract of *Melilotus officinalis* L.

Результаты количественного определения кумарина в сухом экстракте донника лекарственного представлены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ с использованием раствора свидетеля (СО кумарина) в сухом экстракте донника лекарственного установлено наличие кумарина.

Методом ВЭЖХ установлено, что сухой экстракт донника лекарственного содержит $0,642 \pm 0,007$ % кумарина.

ЛИТЕРАТУРА

- Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):98–102. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
 - Kaukhova I. E., Weinstein V. A., Burakova M. A., Aroyan M. V., Novikova E. K. Methods of extraction of medicinal vegetable raw materials in phytosubstances technology. *Advances in Biological Sciences Research. Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences*. 2019;7:140–142. DOI: 10.2991/isils-19.2019.32.
 - Демидова О. А., Архипов В. В., Журавлева М. В., Александрова Т. В., Александров А. А. Безопасность лекарственных растительных препаратов: клинико-фармакологические аспекты. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(4):165–177. DOI: 10.30895/2312-7821-2020-8-4-165-177 1CC.
 - Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А. Разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3:64–67.
 - Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Kaukhova I. E., Aroyan M. V. Modern extraction methods for medicinal plant raw material (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(6):559–563. DOI: 10.1007/s11094-019-02037-5.
 - Bryda O., Stadnytska N. Extraction methods of extractive substances from medicinal plant raw materials: Advantages and limitations. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(5):1737–1751.
 - Hashemi S. M. B., Khaneghah A. M., Koubaa M., Barba F. J., Abedi E., Niakousari M., Tavakoli J. Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 2018;65:197–204. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.020.
 - Al-Snafi A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus officinalis* – A review. *Journal of Pharmacy*. 2020;10(1):26–36.
 - Mirzaei S. Z., Lashgarian H. E., Karkhane M. Bio-inspired silver selenide nano-chalcogens using aqueous extract of *Melilotus officinalis* with biological activities. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021;8:56–63. DOI: 10.1186/s40643-021-00412-3.
 - Liu Y.-T., Gong P.-H., Xiao F.-Q., Shao S., Zhao D.-Q., Yan M.-M., Yang X.-W. Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. *Molecules*. 2018;23(2):271. DOI: 27110.3390/molecules23020271.
 - Aroyan M. V. *Issledovaniya po vybora osnovy dlya gelya na osnove sukhogo ekstrakta donnika lekarstvennogo*. Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего» [Research on the choice of a base for a gel based on a dry extract *Melilotus officinalis* L. Collection of materials of the conference "Young Pharmacy-the potential of the future"]; 2019 April 22–23. St. Petersburg: SPCPU Publishing house; 2019. 922 p. (In Russ.)
- matory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. *Molecules*. 2018;23(2):271. DOI: 27110.3390/molecules23020271.

- Aroyan M. V. Исследования по выбору основы для геля на основе сухого экстракта донника лекарственного. Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»; 2019 22–23 апреля. СПб.: Изд-во СПХФУ; 2019. 922 с.

REFERENCES

- Skibina A. A., Bokov D. O., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylyina I. A. HPLC-analysis of phenolic complex in pectoral species № 4 and its dry extract. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):98–102. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Kaukhova I. E., Weinstein V. A., Burakova M. A., Aroyan M. V., Novikova E. K. Methods of extraction of medicinal vegetable raw materials in phytosubstances technology. *Advances in Biological Sciences Research. Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences*. 2019;7:140–142. DOI: 10.2991/isils-19.2019.32.
- Demidova O. A., Arhipov V. V., Zhuravleva M. V., Aleksandrova T. V., Aleksandrov A. A. Bezopasnost' lekarstvennyh rastitel'nyh preparatov: kliniko-farmakologicheskie aspekty. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii*. 2020;8(4):165–177. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2020-8-4-165-177 1CC.
- Kaukhova I. E., Novikova E. K., Chachin D. A. Development of conditions for the extraction of a series of *Bidens tripartita* herba, *Solidago canadensis* herba, *Agrimonia eupatoria* herba. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(3):64–67. (In Russ.)
- Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Kaukhova I. E., Aroyan M. V. Modern extraction methods for medicinal plant raw material (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(6):559–563. DOI: 10.1007/s11094-019-02037-5.
- Bryda O., Stadnytska N. Extraction methods of extractive substances from medicinal plant raw materials: Advantages and limitations. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(5):1737–1751.
- Hashemi S. M. B., Khaneghah A. M., Koubaa M., Barba F. J., Abedi E., Niakousari M., Tavakoli J. Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 2018;65:197–204. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.020.
- Al-Snafi A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus officinalis* – A review. *Journal of Pharmacy*. 2020;10(1):26–36.
- Mirzaei S. Z., Lashgarian H. E., Karkhane M. Bio-inspired silver selenide nano-chalcogens using aqueous extract of *Melilotus officinalis* with biological activities. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021;8:56–63. DOI: 10.1186/s40643-021-00412-3.
- Liu Y.-T., Gong P.-H., Xiao F.-Q., Shao S., Zhao D.-Q., Yan M.-M., Yang X.-W. Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. *Molecules*. 2018;23(2):271. DOI: 27110.3390/molecules23020271.
- Aroyan M. V. *Issledovaniya po vybora osnovy dlya gelya na osnove sukhogo ekstrakta donnika lekarstvennogo*. Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего» [Research on the choice of a base for a gel based on a dry extract *Melilotus officinalis* L. Collection of materials of the conference "Young Pharmacy-the potential of the future"]; 2019 April 22–23. St. Petersburg: SPCPU Publishing house; 2019. 922 p. (In Russ.)

Таблица 1. Количественное содержание кумарина в сухом экстракте донника лекарственного

Table 1. Quantitative content of coumarin in the dry extract of *Melilotus officinalis* L.

Наименование вещества Ingredient name	\bar{t}_{cr} , мин \bar{t}_{cr} , min	\bar{t}_x , мин \bar{t}_x , min	\bar{S}_{cr} , мВ/с	S_x , мВ/с	Содержание вещества в сухом экстракте, % Substance content in the dry extract, %	Метрологическая характеристика результатов Metrological characteristics of the results
Кумарин Coumarin	19,393	19,417	914281	648886 642695 639902	0,647 0,641 0,638 $X = 0,642 \pm 0,007$	$S^2 = 0,00014$ $S = 0,011$ $\bar{S}_x = 0,0089$ $\epsilon, \% = 1,19$



Разработка и изучение стабильности растворов коменовой кислоты

Т. А. Биткина^{1,2*}, А. В. Басевич¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² ООО «Фарма Ген», 194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4, лит. А

*Контактное лицо: Биткина Татьяна Александровна. E-mail: tatiana.bitkina@pharminnotech.com

ORCID: Т. А. Биткина – <https://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; А. В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 02.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. В статье представлена разработка растворов на основе субстанции коменовой кислоты. Произведена оценка критериев исследуемых составов, влияющих на их стабильность в процессе хранения в рамках концепции Quality-by-Design. Установлены оптимальные составы растворов коменовой кислоты.

Цель. Цель исследования – разработка растворов на основе субстанции коменовой кислоты и определение наиболее стабильных вариантов исполнения.

Материалы и методы. Исследование растворов коменовой кислоты осуществлялось при помощи pH-метра лабораторного PB-11-P11 (SARTORIUS, Германия) и хроматографа жидкостного/ионного «Стайер» (АО «Аквилон», Россия).

Результаты и обсуждения. Проведенное исследование позволило определить наиболее стабильные составы растворов на основе субстанции коменовой кислоты и установить оптимальные показатели критериев их стабильности. Установлено, что растворы коменовой кислоты наиболее стабильны в диапазоне pH: от 4,0 до 6,0. При этом независимо от изученных способов нейтрализации коменовой кислоты растворы нестабильны в концентрациях 25 мг/мл и более.

Заключение. В результате исследования определены оптимальные составы растворов на основе субстанции коменовой кислоты. Произведен сравнительный анализ вспомогательных веществ, повышающих растворимость коменовой кислоты в водных растворителях. Установлены критерии стабильности исследуемых растворов и определены их значения для обеспечения стабильности разрабатываемого препарата.

Ключевые слова: коменовая кислота, стабильность растворов, анальгетическое действие, Quality-by-Design

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

Вклад авторов. Т. А. Биткина, А. В. Басевич – авторы идеи. Т. А. Биткина – проведение экспериментов по разработке и изучению стабильности растворов коменовой кислоты. Т. А. Биткина – проведение обработки данных. Т. А. Биткина, А. В. Басевич – написание текста статьи и обсуждение результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании ООО «Фарма Ген» в лице директора Александра Александровича Резяпкина за содействие при проведении исследований.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России».

Для цитирования: Биткина Т. А., Басевич А. В. Разработка и изучение стабильности растворов коменовой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):108–114. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-108-114](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-108-114)

Development and Study of the Stability of Comenic Acid Solutions

Татьяна А. Биткина^{1,2*}, Анна В. Басевич¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

² "Pharma Gene" LLC, 4A, Tikhoretsky av., Saint-Petersburg, 194064, Russia

*Corresponding author: Татьяна А. Биткина. E-mail: tatiana.bitkina@pharminnotech.com

ORCID: Татьяна А. Биткина – <https://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; Анна В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>.

Received: 20.10.2021

Revised: 02.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. The article presents the development of solutions based on the comenic acid substance. The criteria of the studied compositions that affect their stability during storage are evaluated within the framework of the Quality-by-Design concept. The optimal compositions of comenic acid solutions have been established.

Aim. The purpose of the study is to develop solutions based on the comenic acid substance and determine the most stable variants of execution. Materials and methods. The study of comenic acid solutions was carried out by using a laboratory pH meter PB-11-P11 (SARTORIUS, Germany) and a liquid/ion chromatograph "Stayer" ("Akvilon" JSC, Russia).

Results and discussion. The study made it possible to determine the most stable compositions of solutions based on the comenic acid substance and to establish optimal indicators of their stability criteria. It was found that solutions of comenic acid are the most stable in the pH range: from 4.0 to 6.0. At the same time, regardless of the studied methods of neutralization of comenic acid, solutions are unstable at concentrations of 25 mg/ml or more.

Conclusion. As a result of the study, the optimal compositions of solutions based on the comenic acid substance were determined. A comparative analysis of excipients that increase the solubility of comenic acid in aqueous solvents is performed. The stability criteria of the studied solutions are established and their values for ensuring the stability of the developed drug are determined.

Keywords: comenic acid, sodium salt of comenic acid, analgesic effect, stability of solutions, Quality-by-Design

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. Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – authors of the idea. Tatyana A. Bitkina – conducting experiments to develop and study the stability of comenic acid solutions. Tatyana A. Bitkina – data processing. Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – writing the text of the article and discussing the results.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the Pharma Gene LLC company represented by director Aleksander Aleksandrovich Rezyapkin for assistance in conducting research.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Bitkina T. A., Basevich A. V. Development and study of the stability of comenic acid solutions. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):108-114. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-108-114](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-108-114)

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько десятилетий учеными были обнаружены различные направления фармакологической активности 5-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2-карбоновой кислоты (коменовой кислоты). Известно, что коменовая кислота обладает антиоксидантной активностью, седативным действием, а также нейротропным, антиабстинентным, анксиолитическим и антидепрессантным свойствами. Однако особый интерес вызывает анальгетическая активность данной субстанции. Сравнение в научных трудах обезболивающего действия коменовой кислоты, анальгина и морфина гидрохлорида позволяют делать выводы о высокой анальгетической эффективности субстанции и целесообразности ее дальнейшего исследования в рамках разработки новых ненаркотических сильнодействующих анальгетических лекарственных средств [1–4].

Наиболее ориентированной на международный фармацевтический рынок концепцией для разработки лекарственных средств в настоящее время является подход, предполагающий обеспечение качества через разработку – Quality-by-Design. Данная концепция предполагает централизацию экспериментальных исследований при фармацевтической разработке и выявление критических параметров и критериев изменчивости, влияющих на характеристики готового продукта. Таким образом, при разработке лекарственного средства важно на начальных стадиях определить критерии стабильности и обеспечить их понимание с целью своевременной оптимизации состава и технологии продукта [5–10].

Целью настоящего исследования стала разработка составов инъекционного раствора коменовой кислоты и изучение их стабильности с применением концепций Quality-by-Design.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и реагенты

Ацетонитрил для хроматографии, сорт 0 (ос.ч.) (КРИОХРОМ, Россия), калий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 4198-75), тетрабутиламмония гидросульфат (Sigma Aldrich, США), натрий фосфорнокислый 1-замещенный 2-водный (Panreac, Германия), гидрокарбонат натрия (Panreac, Германия), гидроксид натрия (Panreac, Германия).

Объектом исследования стала синтетическая субстанция коменовой кислоты, представляющая собой мелкокристаллический порошок белого цвета с желто-серым оттенком.

Приборы и оборудование

Измерение водородного показателя исследуемых растворов осуществляли потенциометрически при помощи pH-метра лабораторного РВ-11-Р11 (Sartorius, Германия). Количество содержание активного компонента в растворе и его подлинность исследовали при помощи хроматографа жидкостного/ионного «Стайер» (АО «Аквилон», Россия). Взвешивание реагентов осуществляли на весах МВ 210-А (ООО «Сартогосм», Россия) и ВК-3000.1 (АО «МАССА-К», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные концепции Quality-by-Design, реализуемые в данном исследовании, предполагали определение профиля препарата, потребности использования вспомогательных и действующих веществ, определение критических параметров, влияющих на стабильность препарата, разработку и реализации стратегии контроля.

Согласно научным трудам коменовая кислота в виде раствора для парентерального введения обеспечивает быстрое наступление терапевтического эффекта и действие в течение 6 часов [11], что говорит о целесообразности разработки раствора для инъекций на основе исследуемой субстанции.

Коменовая кислота представляет собой агломераты с кристаллической структурой. Установлено, что исследуемая субстанция мало растворима в растворителях, используемых для получения парентеральных лекарственных форм: натрия хлорида 0,9 %, растворе Рингера, растворе глюкозы 5 %, этаноле 50 %, бензиловом спирте 1 %, глицерине водном 5 %, глицерине водном 30 %, изопропилмитристате, реополиглюкине. Технологические свойства коменовой кислоты определены как удовлетворительные для получения парентеральной лекарственной формы: субстанция обладает удовлетворительной сыпучестью, стабильной насыпной плотностью, незначительной потерей в массе при высушивании, малой гигроскопичностью [12].

Разработка раствора коменовой кислоты, нейтрализованной гидрокарбонатом натрия

В связи с плохой растворимостью коменовой кислоты в водных растворителях для получения растворов исследуемой субстанции использовали вспомогательные вещества, переводящие коменовую кислоту в солевую форму (рисунок 1).

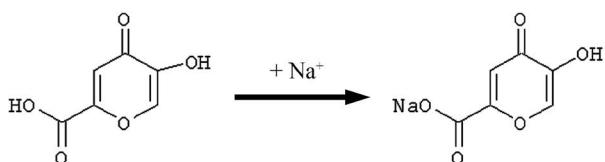


Рисунок 1. Схема реакции получения соли коменовой кислоты

Figure 1. Scheme of the reaction for the preparation of the salt of comenic acid

В качестве источника ионов натрия использовали натрия гидрокарбонат. Для расчета массы натрия гидрокарбоната, необходимого для реакции, использовали формулу (1):

Таблица 1. Составы растворов коменовой кислоты, нейтрализованной натрия гидрокарбонатом

Table 1. Compositions of solutions of comenic acid neutralized with sodium bicarbonate

Компоненты Components	Состав на 100 г раствора в зависимости от концентрации коменовой кислоты, г Composition per 100 g of solution depending on the concentration of comenic acid, g					
	1,0 %	1,5 %	2,0 %	2,5 %	3,0 %	3,5 %
Коменовая кислота Comenic acid	1,01	1,52	2,02	2,53	3,03	3,54
Натрия гидрокарбонат Sodium bicarbonate	0,56	0,83	1,10	1,37	1,65	1,93
Вода для инъекций Water for injections	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g

$$m(\text{NaHCO}_3) = \frac{m(\text{KK})}{M(\text{KK})} \cdot M(\text{NaHCO}_3), \quad (1)$$

где $m(\text{NaHCO}_3)$ – масса гидрокарбоната натрия, г; $m(\text{KK})$ – масса коменовой кислоты, г; $M(\text{KK})$ – молярная масса коменовой кислоты, г/моль; $M(\text{NaHCO}_3)$ – молярная масса гидрокарбоната натрия, г/моль.

Количественное содержание коменовой кислоты в растворе основано на терапевтических свойствах коменовой кислоты, описанных в научных трудах [13]. Полученные составы раствора коменовой кислоты представлены в таблице 1.

Составы апробировали в лабораторных условиях и исследовали стабильность растворов в разных диапазонах pH: 4,0–6,0; 6,0–7,0 и 7,0–8,0.

В ходе исследования стабильности растворы контролировали по следующим параметрам: внешний вид, pH, количественное содержание активного компонента в растворе и его подлинность (таблица 2).

Все растворы на момент проведения испытаний выдерживали проверку на подлинность. Установлено, что растворы коменовой кислоты наиболее стабильны в диапазоне pH 4,0–6,0. Растворы с диапазонами pH 6,0–7,0 и 7,0–8,0 с течением времени значительно меняли цветность, в некоторых образцах наблюдалось выпадение осадка. Растворы с концентрациями коменовой кислоты 30 мг/мл (3,0 %) и 35 мг/мл (3,5 %) наименее стабильны во всех исследуемых диапазонах pH.

Разработка раствора коменовой кислоты, нейтрализованной гидроксидом натрия

При получении растворов коменовой кислоты с натрия гидрокарбонатом наблюдалось интенсивное выделение тепла и пенообразование. В связи с этим в качестве альтернативы источника ионов натрия использовали 10 % раствор натрия гидроксида, что исключало выделение углекислого газа при приготовлении раствора. Для расчета объема 10 % раствора гидроксида натрия, необходимого для проведения реакции использовали формулу (2):

$$V(\text{NaOH}) = \frac{m(\text{KK}) \cdot M(\text{NaOH})}{M(\text{KK}) \cdot p(\text{NaOH})}, \quad (2)$$

Таблица 2. Результаты исследования стабильности растворов коменовой кислоты, нейтрализованной гидрокарбонатом натрия

Table 2. Results of the study of the stability of solutions of comenic acid neutralized with sodium bicarbonate

рН на момент начала опыта pH at the start of the experiment	Количественное содержание коменовой кислоты, мг/мл Quantitative content of comenic acid, mg/ml			рН на момент окончания опыта pH at the end of the experiment	Внешний вид раствора на момент окончания опыта Appearance of the solution at the time of the end of the experiment
	2-й день 2 nd day	11-й день 11 th day	30-й день 30 th day		
<i>Раствор коменовой кислоты 10 мг/мл (1,0%)</i> <i>Comenic acid solution 10 mg/ml (1.0%)</i>					
5,0 ± 0,1	9,94 ± 0,05	10,05 ± 0,10	9,95 ± 0,20	5,7 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
6,5 ± 0,1	9,93 ± 0,01	10,20 ± 0,09	9,96 ± 0,14	6,8 ± 0,1	Светло-желтый, без осадка Light yellow, no sediment
7,6 ± 0,1	10,10 ± 0,02	9,86 ± 0,27	9,48 ± 0,01	7,7 ± 0,1	Ярко-желтый, без осадка Bright yellow, no sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 15 мг/мл (1,5%)</i> <i>Comenic acid solution 15 mg/ml (1.5%)</i>					
5,0 ± 0,1	15,01 ± 0,03	15,34 ± 0,28	15,08 ± 0,10	5,5 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
6,5 ± 0,1	15,27 ± 0,08	15,19 ± 0,33	14,92 ± 0,17	6,8 ± 0,1	Желтый, без осадка Yellow, with sediment
7,5 ± 0,1	15,25 ± 0,06	14,93 ± 0,24	14,31 ± 0,20	7,7 ± 0,1	Желтый, с коричневым оттенком, без осадка Yellow, with a brown tint, no sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 20 мг/мл (2,0%)</i> <i>Comenic acid solution 20 mg/ml (2%)</i>					
5,0 ± 0,1	19,97 ± 0,17	20,15 ± 0,42	20,11 ± 0,36	5,4 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
6,4 ± 0,1	20,11 ± 0,19	19,88 ± 0,62	19,63 ± 0,25	6,7 ± 0,1	Желтый, с коричневым оттенком, без осадка Yellow, with a brown tint, no sediment
7,4 ± 0,1	19,63 ± 0,71	19,51 ± 0,36	18,80 ± 0,23	8,1 ± 0,1	Желто-коричневый, с осадком Yellow-brown, with sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 25 мг/мл (2,5%)</i> <i>Comenic acid solution 25 mg/ml (2.5%)</i>					
5,0 ± 0,1	24,58 ± 0,09	25,03 ± 0,39	25,23 ± 0,12	5,2 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
6,5 ± 0,1	24,84 ± 0,23	24,92 ± 0,45	24,82 ± 0,30	6,7 ± 0,1	Ярко-желтый, без осадка Bright yellow, no sediment
7,5 ± 0,1	24,00 ± 0,17	24,13 ± 0,59	23,60 ± 0,11	7,8 ± 0,1	Желтый, с коричневым оттенком, с осадком Yellow, with a brown tint, with sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 30 мг/мл (3,0%)</i> <i>Comenic acid solution 30 mg/ml (3.0%)</i>					
5,1 ± 0,1	29,19 ± 0,25	30,48 ± 0,30	30,51 ± 0,14	5,4 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, с осадком Colorless, with a yellowish tinge, with sediment
6,5 ± 0,1	29,37 ± 0,37	30,62 ± 0,45	29,95 ± 0,08	6,7 ± 0,1	Ярко-желтый, с осадком Bright yellow, with sediment
7,5 ± 0,1	28,65 ± 0,77	28,50 ± 0,41	27,87 ± 0,45	7,8 ± 0,1	Желтый, с коричневым оттенком, с осадком Bright yellow, with sediment

рН на момент начала опыта pH at the start of the experiment	Количественное содержание коменовой кислоты, мг/мл Quantitative content of comenic acid, mg/ml			рН на момент окончания опыта pH at the end of the experiment	Внешний вид раствора на момент окончания опыта Appearance of the solution at the time of the end of the experiment
	2-й день 2 nd day	11-й день 11 th day	30-й день 30 th day		
<i>Раствор коменовой кислоты 35 мг/мл (3,5 %) Comenic acid solution 35 mg/ml (3.5 %)</i>					
5,0 ± 0,1	35,20 ± 0,73	34,97 ± 0,60	33,28 ± 0,62	5,3 ± 0,1	Светло-желтый, с осадком Bright yellow, with sediment
6,5 ± 0,1	35,04 ± 0,61	34,21 ± 0,09	33,39 ± 0,05	6,9 ± 0,1	Желто-коричневый, с осадком Yellow-brown, with sediment
7,5 ± 0,1	34,04 ± 0,62	32,87 ± 0,40	32,69 ± 0,27	8,1 ± 0,1	Коричневый, с осадком Brown, with sediment

где $V(\text{NaOH})$ – объем 10 % раствора гидроксида натрия, мл; $m(\text{KK})$ – масса коменовой кислоты, г; $M(\text{KK})$ – молярная масса коменовой кислоты, г/моль; $M(\text{NaOH})$ – молярная масса гидрокарбоната натрия, г/моль; $p(\text{NaOH})$ – плотность 10 % раствора гидроксида натрия, г/мл.

Поскольку была установлена нестабильность растворов с содержанием коменовой кислоты 30 мг/мл и 35 мг/мл, данные концентрации исключили из дальнейших исследований. Полученные составы приведены в таблице 3.

Составы растворов коменовой кислоты были апробированы в лабораторных условиях для определения их стабильности в процессе хранения. Учитывая ранее выявленную нестабильность растворов коменовой кислоты в диапазонах pH 6,0–7,0 и 7,0–8,0, исследовали стабильность растворов в более узком диапазоне pH: 4,0–6,0 (таблица 4).

Все растворы на момент проведения испытаний выдерживали проверку на подлинность. Установлено, что исследуемые образцы в течение 30 дней стабильны по показателям внешний вид, pH и количественное содержание коменовой кислоты за исключением образцов с концентрацией 25 мг/мл, в которых выпал осадок.

Сравнение стабильности растворов коменовой кислоты

Анализируя исследуемые способы нейтрализации коменовой кислоты для приготовления водного раствора в рамках разработки инъекционного лекарственного средства можно сделать выводы о целесообразности использования 10 % раствора натрия гидроксида в связи с большей технологичностью: отсутствие риска выброса активного вещества вместе с пеной и парами, образуемыми вследствие выделения углекислого газа, а также нагрева раствора.

Наиболее оптимальный диапазон pH растворов: от 4,0 до 6,0. При этом независимо от способа нейтрализации растворы коменовой кислоты нестабильны в концентрациях 25 мг/мл и более, о чем свидетельствует выпадение осадка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Найдены оптимальные составы растворов на основе субстанции коменовой кислоты.
- Изучена стабильность растворов коменовой кислоты, полученных в лабораторных условиях. Установлено, что растворы коменовой кислоты стабильны в диапазоне pH от 4,0 до 6,0 при концентрации от 10 до 20 мг/мл.

Таблица 3. Составы растворов коменовой кислоты, нейтрализованной 10 % раствором натрия гидроксида

Table 3. Compositions of solutions of comenic acid, neutralized 10 % sodium hydroxide solution

Компоненты Components	Состав на 100 г раствора в зависимости от концентрации коменовой кислоты, г Composition per 100 g of solution depending on the concentration of comenic acid, g			
	1,0 %	1,5 %	2,0 %	2,5 %
Коменовая кислота Comenic acid	1,01	1,52	2,02	2,53
Натрия гидроксид, раствор 10 % Sodium hydroxide, solution 10 %	2,59	3,89	5,17	6,47
Вода для инъекций Water for injections	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g	до 100 г up to 100 g

Таблица 4. Результаты исследования стабильности растворов коменовой кислоты, нейтрализованной 10 % раствором натрия гидроксида

Table 4. Results of the study of the stability of solutions of comenic acid neutralized with 10 % sodium hydroxide solution

рН на момент начала опыта pH at the start of the experiment	Количественное содержание коменовой кислоты, мг/мл Quantitative content of comenic acid, mg/ml			рН на момент окончания опыта pH at the end of the experiment	Внешний вид раствора на момент окончания опыта Appearance of the solution at the time of the end of the experiment
	2 день 2 nd day	11 день 11 th day	30 день 30 th day		
<i>Раствор коменовой кислоты 10 мг/мл (1,0 %)</i> <i>Comenic acid solution 10 mg/ml (1.0 %)</i>					
4,5 ± 0,1	10,07 ± 0,10	10,11 ± 0,18	9,92 ± 0,09	4,5 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
5,0 ± 0,1	10,18 ± 0,12	10,07 ± 0,11	10,04 ± 0,12	5,0 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
5,5 ± 0,1	10,15 ± 0,23	10,01 ± 0,13	10,06 ± 0,11	5,4 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 15 мг/мл (1,5 %)</i> <i>Comenic acid solution 15 mg/ml (1.5 %)</i>					
4,5 ± 0,1	14,85 ± 0,18	14,90 ± 0,11	14,91 ± 0,16	4,5 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
5,0 ± 0,1	15,14 ± 0,18	14,96 ± 0,24	14,90 ± 0,08	5,0 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
5,5 ± 0,1	15,14 ± 0,26	14,91 ± 0,23	14,83 ± 0,28	5,4 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 20 мг/мл (2,0 %)</i> <i>Comenic acid solution 20 mg/ml (2.0 %)</i>					
4,5 ± 0,1	20,24 ± 0,29	20,06 ± 0,10	19,91 ± 0,18	4,5 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
5,0 ± 0,1	20,05 ± 0,20	19,87 ± 0,10	19,92 ± 0,12	5,0 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
5,5 ± 0,1	20,28 ± 0,18	19,98 ± 0,39	19,95 ± 0,34	5,4 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, без осадка Colorless, with a yellowish tinge, no sediment
<i>Раствор коменовой кислоты 25 мг/мл (2,5 %)</i> <i>Comenic acid solution 25 mg/ml (2.5 %)</i>					
4,5 ± 0,1	25,76 ± 0,16	24,84 ± 0,10	24,70 ± 0,54	4,5 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, с осадком Colorless, with a yellowish tinge, with sediment
5,0 ± 0,1	25,93 ± 0,34	24,78 ± 0,09	25,12 ± 0,65	5,0 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, с осадком Colorless, with a yellowish tinge, with sediment
5,5 ± 0,1	25,71 ± 0,41	25,29 ± 0,24	24,93 ± 0,41	5,4 ± 0,1	Бесцветный, с желтоватым оттенком, с осадком Colorless, with a yellowish tinge, with sediment

Данные исследования в дальнейшем будут использованы для трансфера технологии на производственный участок и изучения стабильности опытно-промышленной партии растворов коменовой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shurygina L. V., Zlishcheva E. I., Kravtsova A. N., Kravtsov A. A. Antioxidant and antiamnestic effects of potassium comenate and comenic acid under conditions of normobaric hypoxia with hypercapnia. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;163(3):344–348. DOI: 10.1007/s10517-017-3800-4.
2. Shurygina L. V., Zlishcheva E. I., Kravtsov A. A. Neurotrophic action of comenic acid and its derivatives potassium comenate and calcium comenate. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2018;165(4):465–469. DOI: 10.1007/s10517-018-4195-6.
3. Penniyaynen V. A., Plakhova V. B., Rogachevskii I. V., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V. Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology*. 2019;26(3–4):245–252. DOI: 10.1016/j.pathophys.2019.06.003.
4. Dick O. E., Krylov B. V., Nozdrachev A. D. Possible mechanism of bursting suppression in nociceptive neurons. *Doklady. Biochemistry and biophysics*. 2017;473(1):137–140. DOI: 10.1134/S1607672917020120.
5. Феофилова А. Е., Фотеева А. В., Ростова Н. Б. Современные концепции фармацевтической разработки в условиях перехода к единому регулированию сферы обращения лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):171–179. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-171-179.
6. Mishra V., Thakur S., Patil A., Shukla A. Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert opinion on drug delivery*. 2018;15(8):737–758. DOI: 10.1080/17425247.2018.1504768.
7. Ter H. J. P., Turimella S. L., Metsers F., Zwiers A. Implementation of Quality by Design (QbD) principles in regulatory dossiers of medicinal products in the European Union (EU) between 2014 and 2019. *Therapeutic innovation & regulatory science*. 2021;55(3):583–590. DOI: 10.1007/s43441-020-00254-9.
8. Swain S., Parhi R., Jena B. R., Babu S. M. Quality by Design: Concept to Applications. *Current drug discovery technologies*. 2019;16(3):240–250. DOI: 10.2174/1570163815666180308142016.
9. Zhang L., Mao S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2017;12(1):1–8. DOI: 10.1016/j.ajps.2016.07.006.
10. Henriques J., Cardoso C., Vitorino C. On demand for new process analytical technologies applied to injectable drug products. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2019;137:104975. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.104975.
11. Лопатина Е. В., Поляков Ю. И. Синтетический аналгетик аноцептин: результаты доклинических и клинических исследований. *Эфферентная терапия*. 2011;17(3):79–81. (In Russ.)
12. Биткина Т. А. Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции – производных гамма-пирона. Научно-практический журнал *Фармация, специальный выпуск: «Сборник конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»*. 2019: 208–210.
13. Крылов Б. В., Лопатина Е. В. Синтетическое анальгетическое средство и способ лечения на основе этого средства. Патент РФ на изобретение № RU 2322977 С1. 27.04.2008. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2322977C1/ru>. Ссылка активна на 29.10.2021.
2. Shurygina L. V., Zlishcheva E. I., Kravtsov A. A. Neurotrophic action of comenic acid and its derivatives potassium comenate and calcium comenate. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2018;165(4):465–469. DOI: 10.1007/s10517-018-4195-6.
3. Penniyaynen V. A., Plakhova V. B., Rogachevskii I. V., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V. Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology*. 2019;26(3–4):245–252. DOI: 10.1016/j.pathophys.2019.06.003.
4. Dick O. E., Krylov B. V., Nozdrachev A. D. Possible mechanism of bursting suppression in nociceptive neurons. *Doklady. Biochemistry and biophysics*. 2017;473(1):137–140. DOI: 10.1134/S1607672917020120.
5. Feofilova A. E., Foteeva A. V., Rostova N. B. The modern concepts of pharmaceutical development in the context of the transition to a uniform regulation of medicinal products circulation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):171–179. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-171-179.
6. Mishra V., Thakur S., Patil A., Shukla A. Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert opinion on drug delivery*. 2018;15(8):737–758. DOI: 10.1080/17425247.2018.1504768.
7. Ter H. J. P., Turimella S. L., Metsers F., Zwiers A. Implementation of Quality by Design (QbD) principles in regulatory dossiers of medicinal products in the European Union (EU) between 2014 and 2019. *Therapeutic innovation & regulatory science*. 2021;55(3):583–590. DOI: 10.1007/s43441-020-00254-9.
8. Swain S., Parhi R., Jena B. R., Babu S. M. Quality by Design: Concept to Applications. *Current drug discovery technologies*. 2019;16(3):240–250. DOI: 10.2174/1570163815666180308142016.
9. Zhang L., Mao S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2017;12(1):1–8. DOI: 10.1016/j.ajps.2016.07.006.
10. Henriques J., Cardoso C., Vitorino C. On demand for new process analytical technologies applied to injectable drug products. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2019;137:104975. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.104975.
11. Lopatina E. V., Polyakov Yu. I. Synthetic analgesic anoceptin: results of preclinical and clinical studies. *Efferentnaya terapiya*. 2011;17(3):79–81. (In Russ.)
12. Bitkina T. A. Study of the physicochemical and technological properties of the substance – derivatives of gamma pyrone. *Nauchno-prakticheskiy zhurnal Farmatsiya, spetsial'nyy vypusk: «Sbornik konferentsii «Molodaya farmatsiya – potentsial budushchego» = Scientific and practical journal Pharmacy, special issue: «Collection of the conference» Young pharmacy – the potential of the future»*. 2019:208–210. (In Russ.)
13. Krylov B. V., Lopatina E. V. *Sinteticheskoye anal'geticheskoye sredstvo i sposob lecheniya na osnove etogo sredstva* [Synthetic analgesic agent and method for treatment based on this agent]. Patent RUS № 2322977 C1. 27.04.2008. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2322977C1/ru>. Accessed: 29.10.2021. (In Russ.)

REFERENCES

1. Shurygina L. V., Zlishcheva E. I., Kravtsova A. N., Kravtsov A. A. Antioxidant and antiamnestic effects of potassium comenate and comenic acid under conditions of normobaric hypoxia with hypercapnia. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;163(3):344–348. DOI: 10.1007/s10517-017-3800-4.



Установление количественного содержания 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия в стандартном образце

Е. В. Куваева, Д. А. Колесник*, П. О. Левшукова, И. И. Тернинко, И. П. Яковлев,
Е. В. Федорова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Колесник Денис Андреевич. E-mail: denis.kolesnik@spcpu.ru

ORCID: Е. В. Куваева – <https://orcid.org/0000-0002-1894-884X>; Д. А. Колесник – <https://orcid.org/0000-0002-5527-6595>; П. О. Левшукова – <https://orcid.org/0000-0001-6229-0339>;
И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; И. П. Яковлев – <https://orcid.org/0000-0003-1251-8782>; Е. В. Федорова – <https://orcid.org/0000-0003-0499-3401>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 03.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Использование стандартных образцов (СО) является необходимым условием для осуществления контроля качества лекарственных средств. Их разработка является актуальной проблемой фармацевтической отрасли, особенно для новых биологически активных соединений, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве лекарственных средств.

Цель. Целью работы является установление количественного содержания 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия, для которого ранее была доказана противовоспалительная и анальгезирующая активность, в стандартном образце.

Материалы и методы. Основным способом установления количественного содержания вещества в СО является метод материального баланса. Определение воды проводили по методу К.Фишера (полумикрометод). Сульфатную золу определяли согласно ОФС.1.2.2.2.20014.15 «Сульфатная зора» Государственной фармакопеи РФ XIV издания. Родственные примеси и их содержание оценили с помощью метода ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Flexar, оснащенным диодно-матричным детектором (Perkin Elmer, США). Определение остаточных растворителей проводили парофазным методом с использованием газового хроматографа GC-2010Plus Shimadzu с пламенно-ионизационным детектором. В качестве дополнительного метода установления количественного содержания основного компонента было проведено ацидиметрическое титрование с потенциометрической индикацией точки эквивалентности.

Результаты и обсуждения. Установлено процентное содержание по следующим показателям: вода, остаточные органические растворители, родственные примеси, сульфатная зора. С помощью метода материального баланса показано, что процентное содержание 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия в стандартном образце составляет $96,01 \pm 0,50\%$. Ацидиметрическим титрованием определено, что количественное содержание 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия в СО – $95,12 \pm 0,02\%$. Разницу в аттестованном значении можно пояснить тем, что при титровании выделяется аци-форма СО, которая выпадает в осадок в водной среде и способствует смещению равновесия и значения рН. Следовательно, точка эквивалентности достигается несколько ранее. Однако данные практически сопоставимы.

Заключение. Определены параметры аттестации стандартного образца: содержание воды, остаточных органических растворителей, сульфатная зора, родственные примеси. Установлено количественное содержание основного компонента с помощью метода материального баланса и титриметрии (ацидиметрия с потенциометрической индикацией точки эквивалентности).

Ключевые слова: материальный баланс, ацидиметрия, гидроксиоксопириимииды, родственные примеси, остаточные растворители

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

Вклад авторов. Е. В. Федорова – проводила поиск методик определения остаточных органических растворителей, сульфатной зоры, воды. Е. В. Куваева – разрабатывала методику определения родственных примесей. Д. А. Колесник, П. О. Левшукова – выполняли экспериментальную часть. И. И. Тернинко, И. П. Яковлев – руководили научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Куваева Е. В., Колесник Д. А., Левшукова П. О., Тернинко И. И., Яковлев И. П., Федорова Е. В. Установление количественного содержания 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия в стандартном образце. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4–1):115–121. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-115-121](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-115-121)

The Sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate Quantitative Content Determination in a Standard Sample

Elena V. Kuvaeva, Denis A. Kolesnik*, Polina O. Levshukova, Inna I. Terninko,
Igor P. Yakovlev, Elena V. Fedorova

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Denis A. Kolesnik. E-mail: denis.kolesnik@spcpu.ru

© Куваева Е. В., Колесник Д. А., Левшукова П. О., Тернинко И. И., Яковлев И. П., Федорова Е. В., 2021
© Куваева Е. В., Колесник Д. А., Левшукова П. О., Тернинко И. И., Яковлев И. П., Федорова Е. В., 2021

Abstract

Introduction. The standard samples (SS) use is a necessary condition for the medicines' quality control implementation. Their development is an urgent problem for the pharmaceutical industry, especially for new biologically active compounds that can be further used as pharmaceuticals.

Aim. This work aim is to establish the 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydro pyrimidone-4-olate sodium quantitative content, for which anti-inflammatory and analgesic activity was previously proven, in a standard sample.

Materials and methods. This work aim is to establish the 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydro pyrimidone-4-olate sodium quantitative content, for which anti-inflammatory and analgesic activity was previously proven, in a standard sample. The main method for establishing a substance quantitative content in the SS is the material balance method. The water determination was carried out according to K. Fisher's method (semi-micro method). Sulphated ash was determined according to the XIV edition Russian Federation State Pharmacopoeia General Pharmacopoeia Monograph "Sulphated ash". Related impurities and their content were assessed using the HPLC method on a Flexar liquid chromatograph equipped with a diode array detector (Perkin Elmer, USA). The residual solvents' determination was carried out by the headspace method using a gas chromatograph GC-2010Plus Shimadzu with a flame ionization detector. As an additional method for establishing the main component quantitative content, acidimetric titration with the equivalence point potentiometric indication was carried out.

Results and discussion. The percentage was determined for the following indicators: water, residual organic solvents, related impurities, sulphated ash. Using the material balance method, it was found that the 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-olate sodium percentage in a standard sample is $96.01 \pm 0.50\%$. It was found by acidimetric titration that the 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-olate sodium quantitative content in SS is $95.12 \pm 0.02\%$. The difference in the certified value can be explained by the fact that during titration, the SS aciform is released, which precipitates in an aqueous medium and contributes to a shift in the equilibrium and pH value. Consequently, the equivalence point is reached somewhat earlier. However, the data are practically comparable, but it is necessary to use the value obtained by the material balance method.

Conclusion. A standard sample certification parameters were determined: water content, residual organic solvents, sulphated ash, related impurities. The main component quantitative content was determined using the material balance method and titrimetry (acidimetry with the equivalence point potentiometric indication).

Keywords: material balance, acidimetry, hydroxyoxopyrimidines, related impurities, residual solvents

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 V. Fedorova – searched for methods for determining residual organic solvents, sulphated ash, water. Elena V. Kuvaeva – developed a method for the related impurities determination. Denis A. Kolesnik, Polina O. Levshukova – performed the experimental part. Inna I. Terninko, Igor P. Yakovlev – supervised scientific research. All authors participated in the results' discussion.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Kuvaeva E. V., Kolesnik D. A., Levshukova P. O., Terninko I. I., Yakovlev I. P., Fedorova E. V. The sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate quantitative content determination in a standard sample. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4–1):115–121. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-115-121](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-115-121)

ВВЕДЕНИЕ

Использование стандартных образцов (СО) является необходимым условием для осуществления контроля качества лекарственных средств. Их разработка является актуальной проблемой фармацевтической отрасли, особенно для новых биологически активных соединений, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве лекарственных средств.

Ранее на кафедре органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России на основе N-арилбензамидинов [1–3] были получены новые водорастворимые гидроксиоксопиrimидины [4–14].

Целью работы является установление количественного содержания 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиrimидин-4-олята натрия (рисунок 1), для которого ранее была доказана противовоспалительная [15, 16] и анальгезирующая [17] активность, в стандартном образце.

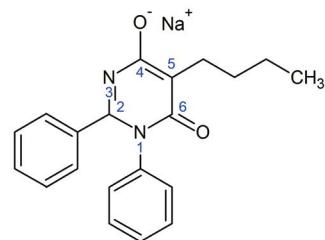


Рисунок 1. Структурная формула 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиrimидин-4-олята натрия

Figure 1. The structural formula of 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidone-4-olate sodium

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основным способом установления количественного содержания вещества в СО является метод материального баланса, так как данный метод макси-

мально учитывает показатели, которые не относятся к содержанию основного вещества (органические примеси, неорганические примеси, вода и остаточные органические растворители).

Формула материального баланса:

$$X\% = 100\% - (\text{вода, \%} + \text{OOP, \%}) - (\text{C3, \%}) - (\text{РП, \%}).$$

где ООР – остаточные органические растворители; С3 – сульфатная зола; РП – родственные примеси.

Определение воды

Определение воды проводили по методу К. Фишера (полумикрометод) [18].

Установка титра: 0,0315 г воды смешивали с 5 мл метанола и титровали реагентом Фишера до изменения окраски от желтой до красновато-коричневой.

Опытная проба: точную навеску (0,3 г) исследуемого вещества растворяли в 5 мл метанола и титровали реагентом Фишера до изменения окраски от желтой до красновато-коричневой.

Контрольный опыт: 5 мл метанола титровали реагентом Фишера до изменения окраски от желтой до красновато-коричневой.

Титр реагента Фишера по воде рассчитывали по формуле:

$$T(\text{реактив/вода}) = \frac{a(\text{воды})}{V_1 - V_2},$$

где V_1 – объем реагента Фишера, пошедший на титрование навески воды; V_2 – объем реагента Фишера, пошедший на контрольный опыт.

Содержание воды в стандартном образце вычисляли по формуле:

$$\text{Вода, \%} = \frac{(V_o - V_{k.o.}) \cdot T \left(\frac{\text{реактив}}{\text{вода}} \right) \cdot 100\%}{a},$$

где V_o – объем реагента Фишера, пошедший на титрование опытной пробы; $V_{k.o.}$ – объем реагента Фишера, пошедший на контрольный опыт; $T(\text{реактив/вода})$ – титр реагента Фишера по воде; a – навеска исследуемого вещества.

Сульфатная зола

Сульфатную золу определяли согласно ОФС.1.2.2.2.0014.15 «Сульфатная зола» Государственной фармакопеи РФ XIV издания. Точная навеска составляла 1,0 грамм [18].

Родственные примеси

Родственные примеси, а именно технологические, и их содержание оценили с помощью метода ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Flexar, оснащенным диодно-матричным детектором (Perkin Elmer, США).

Подвижная фаза (ПФ). Ацетонитрил – 0,1 % фосфорная кислота 35:65.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещали 10,0 мг (точная навеска) субстанции, растворяли в подвижной фазе (ПФ) и доводили объем раствора ПФ до метки.

Хроматографические условия

Колонка: 15 × 0,46 см силикагель октадиенильный эндкапированный для хроматографии, размер частиц 5 мкм

Температура колонки: 25 °C;

Скорость потока: 1,0 мл/мин; спектрофотометрический, 240 нм;

Детектор: 10 мкл

Объем пробы: 10 мкл

Время двукратное от времени удерхроматографирования живания основного пика

Содержание родственных примесей рассчитывали по методу внутренней нормализации. Данный метод подразумевает, что на хроматограмме зарегистрированы все вещества, входящие в состав анализируемой смеси, и что сумма их площадей пиков равно 100 %. Содержание каждого компонента смеси рассчитывали по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\sum_{i=1}^n S_i},$$

где S_i – площадь пика определяемого компонента, $\sum_{i=1}^n S_i$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме.

Остаточные органические растворители

Определение остаточных растворителей проводили парофазным методом с использованием газового хроматографа GC-2010Plus Shimadzu. Детектор – пламенно-ионизационный.

Исходя из схемы получения образца 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиrimидин-4-олята натрия, нами были заявлены следующие остаточные органические растворители для контроля: N,N-диметилформамид (ДМФА), ацетон.

ДМФА относится ко 2 классу токсичности [18], использовался в процессе получения.

Ацетон относится к 3 классу токсичности [18], использовался на этапе получения стандартного образца методом перекристаллизации.

В качестве стандартных образцов были использованы: N,N-диметилформамид (ДМФА) (марка: х.ч., Вектон), ацетон (марка х.ч., Вектон).

Хроматографические условия

Колонка:	Колонка для ГХ Rtx®-1301, 1,8 мкм, 30 м × 0,32 мм, Restek, 16092
Температура колонки:	100 °C
Скорость потока:	1,0 мл/мин
Детектор:	пламенно-ионизационный
Объём пробы:	1 мкл
Время хроматографирования	двукратное от времени удерживания основного пика

В качестве растворителя был выбран диметилсульфоксид (ДМСО), поскольку он обладает высокой температурой кипения и крайне медленно испаряется при нормальном атмосферном давлении.

Пробоподготовка

Диметилсульфоксид: 5 мл ДМСО помещали в пенициллический стакан, который укупоривали металлической крышкой. Далее термостатировали в течение 30 минут при температуре 80 °C, затем чистым хроматографическим шприцом отбирали 1,0 мкл газовой фазы и вводили в дозирующее устройство газового хроматографа [19].

Стандартный раствор ацетона: 5 мл ДМСО и 1 мл ацетона помещали в пенициллический стакан, который укупоривали металлической крышкой. Далее термостатировали в течение 30 минут при температуре 80 °C, затем чистым хроматографическим шприцом отбирали 1,0 мкл газовой фазы и вводили в дозирующее устройство газового хроматографа [19].

Стандартный раствор N,N-диметилформамида: 5 мл ДМСО и 1 мл ДМФА помещали в пенициллический стакан, который укупоривали металлической крышкой. Далее термостатировали в течение 30 минут при температуре 80 °C, затем чистым хроматографическим шприцом отбирали 1,0 мкл газовой фазы и вводили в дозирующее устройство газового хроматографа [19].

Испытуемый раствор: 5 мл ДМСО и 0,2 г исследуемой субстанции помещали в пенициллический флаон, закупоривали резиновой пробкой и помещали в металлический стакан, который укупоривали металлической крышкой. Далее термостатировали в течение 30 минут при температуре 80 °C, затем чистым хроматографическим шприцом отбирали 1,0 мкл газовой фазы и вводили в дозирующее устройство газового хроматографа [19].

Содержание остаточных растворителей рассчитывали по методу внутренней нормализации по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\sum_{i=1}^n S_i},$$

где S_i – площадь пика определяемого компонента, $\sum_{i=1}^n S_i$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме.

В качестве дополнительного метода установления количественного содержания основного компонента было проведено ацидиметрическое титрование с потенциометрической индикацией точки эквивалентности.

Индикаторный электрод: стеклянный электрод.

Электрод сравнения: хлорсеребряный.

Методика: Точную навеску (0,3 г) исследуемого вещества растворяли в 50 мл воды. В полученный раствор погружали индикаторный электрод и электрод сравнения, стакан устанавливали на магнитную мешалку. Проводили первое – ориентировочное титрование, добавляя по 1 мл 0,1 М раствором соляной кислоты. Фиксировали скачок разности потенциалов.

Затем проводили второе титрование новой порции раствора, прибавляя по 0,1 мл 0,1 М раствором соляной кислоты в области предполагаемой точки эквивалентности (ТЭ). По результатам второго титрования фиксировали скачок разности потенциалов и определяли ТЭ.

Схема реакции представлена на рисунке 2:

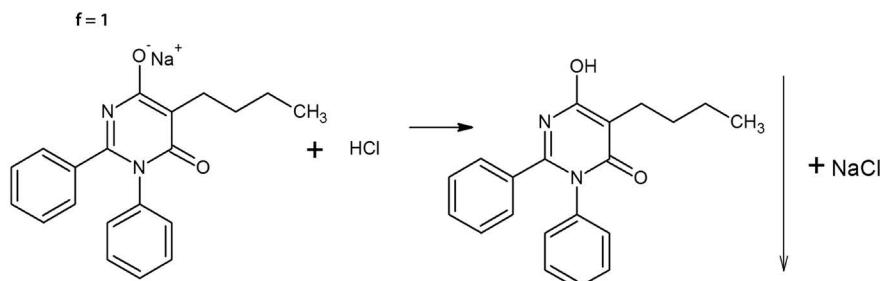


Рисунок 2. Химизм взаимодействия 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олята натрия с соляной кислотой

Figure 2. Chemistry of the interaction of 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate sodium with hydrochloric acid

Титр 0,1 М раствора соляной кислоты по исследуемому веществу рассчитывали по формуле:

$$T(\text{HCl}/\text{вещество}) = \frac{C(\text{HCl}) \cdot M.m.(\text{вещество}) \cdot f}{1000},$$

где $C(\text{HCl})$ – концентрация соляной кислоты, М; $M.m.$ – молярная масса определяемого вещества; f – фактор эквивалентности.

Процентное содержание основного компонента в стандартном образце определяли по формуле:

$$X, \% = \frac{V(\text{HCl}) \cdot K \cdot T(\text{HCl}/\text{вещество}) \cdot 100 \cdot 100 \%}{a \cdot (100 - \% \text{ воды} - \% \text{ OOP})},$$

где $V(\text{HCl})$ – объем соляной кислоты, пошедший на титрование определяемого вещества; $T(\text{HCl}/\text{вещество})$ – титр соляной кислоты по веществу; K – поправочный коэффициент; % воды – процентное содержание воды в образце; % ООР – процентное содержание остаточных растворителей в образце; a – навеска исследуемого вещества.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Определение воды

$$V_1 = 19,4 \text{ мл}, V_{\text{к.о.}} = 1,1 \text{ мл.}$$

$$T(\text{реактив/вода}) = \frac{0,0315}{19,4 - 1,1} = 0,00172 \text{ г/мл.}$$

Содержание воды в СО 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия составило $3,46 \pm 0,27 \%$.

Сульфатная зола

Содержание сульфатной золы – $0,09 \pm 0,01 \%$.

Родственные примеси

Хроматограмма испытуемого образца представлена на рисунке 3. Данные хроматограммы представлены в таблице 1.

Содержание суммы неидентифицированных примесей составляет $0,25 \pm 0,03 \%$.

Остаточные органические растворители

Хроматограмма раствора субстанции отображена на рисунке 4. Данные хроматограммы представлены в таблице 2.

В результате определения ООР было установлено, что процентное содержание ДМФА составило $0,03 \pm 0,002 \%$ ($300 \pm 20 \text{ ppm}$), ацетона – $0,161 \pm 0,03 \%$ ($1610 \pm 300 \text{ ppm}$). Суммарное содержание ООР – $0,191 \pm 0,04 \%$ ($1910 \pm 400 \text{ ppm}$).

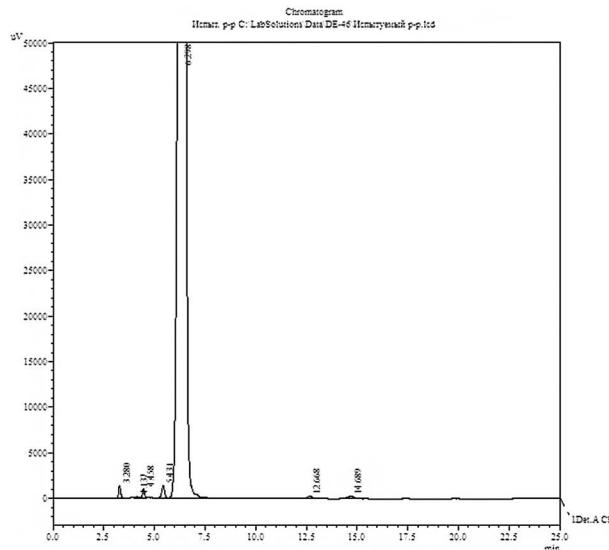


Рисунок 3. Хроматограмма испытуемого образца 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия

Figure 3. Chromatogram of the test sample 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate sodium

Таблица 1. Данные хроматограммы испытуемого образца 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия

Table 1. Chromatogram data of the test sample 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate sodium

№	Время удерживания, мин Retention time, min	% содержание Content, %
1	3,280	0,055
2	4,137	0,009
3	4,458	0,043
4	5,431	0,080
5 (исследуемое соединение) 5 (test compound)	6,298	99,752
6	12,668	0,025
7	14,689	0,035
Общее Total		100,000

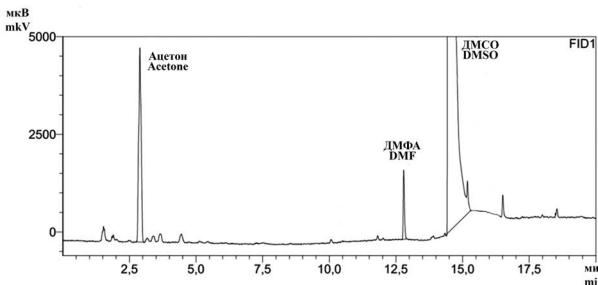


Рисунок 4. Хроматограмма испытуемого образца 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия

Figure 4. Chromatogram of the test sample 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate sodium

Таблица 2. Данные хроматограммы испытуемого образца 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олят натрия

**Table 2. Chromatogram data of the test sample
5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate sodium**

Пик Peak	Вещество Compound	Время удерживания, мин Retention time, min	Площадь, % Square, %
1	Ацетон Acetone	2,891	0,161
2	ДМФА DMFA	12,790	0,030
3	ДМСО DMSO	14,598	99,810
Сумма Total	–	–	100,000

Количественное содержание

С помощью метода материального баланса установлено, что процентное содержание 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олята натрия в стандартном образце – $96,01 \pm 0,50$ %.

Ацидиметрическим титрованием определено, что количественное содержание 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олята натрия в СО составляет $95,12 \pm 0,02$ %. Разницу в аттестованном значении можно пояснить тем, что при титровании выделяется аци-форма СО, которая выпадает в осадок в водной среде и способствует смещению равновесия и значения pH. Следовательно, точка эквивалентности достигается несколько ранее, однако данные практически сопоставимы.

На рисунке 5 представлена кривая титрования.

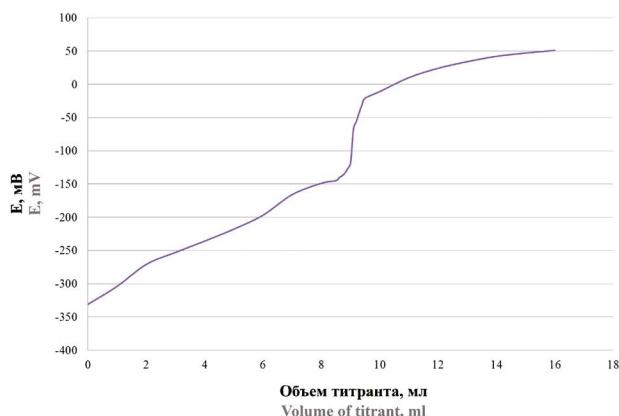


Рисунок 5. Кривая титрования 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-4-олята натрия 0.1М раствором хлористоводородной кислоты

Figure 5. Titration curve of 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate sodium with 0.1 M hydrochloric acid solution

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены параметры аттестации стандартного образца: содержание воды, остаточных органических растворителей, сульфатная зола, родственные приме-

си. Установлено количественное содержание основного компонента с помощью метода материального баланса и титриметрии (ацидиметрия с потенциометрической индикацией точки эквивалентности).

ЛИТЕРАТУРА

- Куваева Е. В., Федорова Е. В., Ксенофонтова Г. В., Семакова Т. Л., Яковлев И. П. N-арилбензамидинов гидрохлориды. Синтез и строение. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):108–109.
- Куваева Е. В., Колесник Д. А., Ксенофонтова Г. В., Семакова Т. Л., Яковлев И. П. Синтез и строение некоторых N-арилбензамидинов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(4):140–143.
- Koutentis P. A., Mirallai S. I. Reinvestigating the synthesis of N-arylbenzamidines from benzonitriles and anilines in the presence of AlCl₃. *Tetrahedron*. 2010;66(27–28):5134–5139. DOI: 10.1016/j.tet.2010.04.103.
- Колесник Д. А., Куваева Е. В., Яковлев И. П., Кириллова Е. Н., Семакова Т. Л. Синтез гидрофильных форм 6-гидроксипиридин-4(3Н)-онов и оценка их острой токсичности *in silico* и *in vivo*. *Бутлеровские сообщения*. 2021;66(4):41–45. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/21-66-4-41.
- Myers M. C., Bilder D. M., Cavallaro C. L., Chao H. J., Su S., Burford N. T., Michael Lawrence R. Discovery and SAR of Aryl Hydroxy Pyrimidinones as Potent Small Molecule Agonists of the GPCR APJ. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020;30(7):126955. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.126955.
- Kochia K., Bayat M., Nasri S., Mohammadi A. Synthesis of new pyrimidine-containing compounds: 5-(2-(alkylamino)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-6-hydroxypyrimidine-2,4(1H,3H)-dione derivatives. *Molecular Diversity*. 2020;24(4):1015–1024. DOI: 10.1007/s11030-019-10009-w.
- Feng G.-S., Chen M.-W., Shi L., Zhou Y.-G. Facile Synthesis of chiral cyclic ureas through hydrogenation of 2-hydroxypyrimidine/pyrimidin-2(1H)-one tautomers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018;57(20):5853–5857. DOI: 10.1002/anie.201801485.
- Holt-Martyn J., Chowdhury R., Tumber A., Yeh T.-L., Abboud M. I., Lippi K., Schofield C. Structure–Activity Relationship and Crystallographic Studies On 4-Hydroxypyrimidine HIF Prolyl Hydroxylase Domain Inhibitors. *ChemMedChem*. 2020;15(3):270–273. DOI: 10.1002/cmcd.201900557.
- Wang L., Tang J., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Biphenylmethyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones potently and selectively inhibited HIV reverse transcriptase-associated RNase H. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;156:680–691. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.07.035.
- Wang L., Tang J., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Xie J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Arylthio-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones potently inhibited HIV reverse transcriptase-associated RNase H with antiviral activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;156:652–665. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.07.039.
- Garcia-Valdivia A. A., Romero F. J., Cepeda J., Morales D. P., Casati N., Mota A. J., Zotti L. A., Palacios J. J., Choquesillo-Lazarte D., Salmerón F. J., Rivadeneyra A., Rodríguez-Díez A. Rational design of an unusual 2D-MOF based on Cu(I) and 4-hydroxypyrimidine-5-carbonitrile as linker with conductive capabilities: a theoretical approach based on high-pressure XRD. *Chemical Communication Journal*. 2020;56(66):9473–9476. DOI: 10.1039/d0cc03564e.
- Muhammad M. T., Khan K. M., Khan A. A., Arshad F., Fatima B., Choudhary M. I., Syed N., Moin S. T. Syntheses of 4,6-dihydroxypyrimidine diones, their urease inhibition, *in vitro*, *in silico*, and kinetic studies. *Bioorganic Chemistry*. 2017;75:317–331. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.08.018.
- Vu T. Q., Yudin N. V., Kushtaev A. A., Nguyen T. X., Maltsev S. A. Spectroscopic study of the basicity of 4,6-dihydroxypyrimidine derivatives. *ACS Omega*. 2021;6(22):14154–14163. DOI: 10.1021/acsomega.1c00671.

14. Beykin D., Kumar G., Zhou W., Park J., Jeevan T., Lagisetti C., Harfoot R., Webby R. J., White S. W., Webb T. R. Protein-structure assisted optimization of 4,5-dihydroxypyrimidine-6-carboxamide inhibitors of influenza virus endonuclease. *Scientific Reports*. 2017;7(1):17139. DOI: 10.1038/s41598-017-17419-6.
15. Куваева Е. В., Колесник Д. А., Левшукова П. О., Кириллова Е. Н., Ивкин Д. Ю. Оценка противовоспалительной активности нового производного 1,6-дигидропirimидина. *Фармация*. 2021;70(4):44–47. DOI: 10/29296/25419218-2021-04-07.
16. Колесник Д. А., Куваева Е. В., Ивкин Д. Ю., Левшукова П. О., Кириллова Е. Н., Яковлев И. П. 1,2-Дифенил-5-бутил-6-оксо-1,6-дигидропirimидин-4-олят натрия и способ его получения. Патент РФ на изобретение № RU 2757391 C1. 14.10.2021. Доступно по: https://www.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2757391&TypeFile=html. Ссылка активна на 30.10.2021.
17. Куваева Е. В., Колесник Д. А., Левшукова П. О., Ивкин Д. Ю., Яковлев И. П. Синтез и оценка анальгезирующей активности нового 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропirimидин-4-олята натрия. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;24(6):42–46. DOI: 10.29296/25877313-2021-06-06.
18. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 28.10.2021.
19. United States Pharmacopeia (USP 38) and the 33th edition of the National Formulary (NF 33). 2015.

REFERENCES

1. Kuvaeva E. V., Fedorova E. V., Ksenofontova G. V., Semakova T. L., Yakovlev I. P. N-arylbenzamidines hydrochlorides. Synthesis and structure. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;(3):108–109. (In Russ.)
2. Kuvaeva E. V., Kolesnik D. A., Ksenofontova G. V., Semakova T. L., Yakovlev I. P. Synthesis and structure of some N-arylbenzamidines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;(4):140–143. (In Russ.)
3. Koutentis P. A., Mirallai S. I. Reinvestigating the synthesis of N-arylbenzamidines from benzonitriles and anilines in the presence of AlCl₃. *Tetrahedron*. 2010;66(27–28):5134–5139. DOI: 10.1016/j.tet.2010.04.103.
4. Kolesnik D. A., Kuvaeva E. V., Yakovlev I. P., Kirillova E. N., Semakova T. L. 6-hydroxypyrimidine-4(3H)-ones hydrophilic forms synthesis and their acute toxicity in silico and in vivo. *Butlerovskie soobshcheniya*. 2021;66(4):41–45. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/21-66-4-41. (In Russ.)
5. Myers M. C., Bilder D. M., Cavallaro C. L., Chao H. J., Su S., Burford N. T., Michael Lawrence R. Discovery and SAR of Aryl Hydroxy Pyrimidinones as Potent Small Molecule Agonists of the GPCR APJ. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020;30(7):126955. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.126955.
6. Kochia K., Bayat M., Nasri S., Mohammadi A. Synthesis of new pyrimidine-containing compounds: 5-(2-(alkylamino)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-6-hydroxypyrimidine-2,4(1H,3H)-dione derivatives. *Molecular Diversity*. 2020;24(4):1015–1024. DOI: 10.1007/s11030-019-10009-w.
7. Feng G.-S., Chen M.-W., Shi L., Zhou Y.-G. Facile Synthesis of chiral cyclic ureas through hydrogenation of 2-hydroxypyrimidine/pyrimidin-2(1H)-one tautomers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018;57(20):5853–5857. DOI: 10.1002/anie.201801485.
8. Holt-Martyn J., Chowdhury R., Tumber A., Yeh T.-L., Abboud M. I., Lippi K., Schofield C. Structure–Activity Relationship and Crystallographic Studies On 4-Hydroxypyrimidine HIF Prolyl Hydroxylase Domain Inhibitors. *ChemMedChem*. 2020;15(3):270–273. DOI: 10.1002/cmcd.201900557.
9. Wang L., Tang J., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Biphenyl-methyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones potently and selectively inhibited HIV reverse transcriptase-associated RNase H. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;156:680–691. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.07.035.
10. Wang L., Tang J., Huber A. D., Casey M. C., Kirby K. A., Wilson D. J., Kankanala J., Xie J., Parniak M. A., Sarafianos S. G., Wang Z. 6-Arylthio-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones potently inhibited HIV reverse transcriptase-associated RNase H with antiviral activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;156:652–665. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.07.039.
11. García-Valdivia A. A., Romero F. J., Cepeda J., Morales D. P., Casati N., Mota A. J., Zotti L. A., Palacios J. J., Choquesillo-Lazarte D., Salmerón F. J., Rivadeneira A., Rodríguez-Díéguez A. Rational design of an unusual 2D-MOF based on Cu(I) and 4-hydroxypyrimidine-5-carbonitrile as linker with conductive capabilities: a theoretical approach based on high-pressure XRD. *Chemical Communication Journal*. 2020;56(66):9473–9476. DOI: 10.1039/d0cc03564e.
12. Muhammad M. T., Khan K. M., Khan A. A., Arshad F., Fatima B., Choudhary M. I., Syed N., Moin S. T. Syntheses of 4,6-dihydroxypyrimidine diones, their urease inhibition, in vitro, in silico, and kinetic studies. *Bioorganic Chemistry*. 2017;75:317–331. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.08.018.
13. Vu T. Q., Yudin N. V., Kushtaev A. A., Nguyen T. X., Maltsev S. A. Spectroscopic study of the basicity of 4,6-dihydroxypyrimidine derivatives. *ACS Omega*. 2021;6(22):14154–14163. DOI: 10.1021/acsomega.1c00671.
14. Beykin D., Kumar G., Zhou W., Park J., Jeevan T., Lagisetti C., Harfoot R., Webby R. J., White S. W., Webb T. R. Protein-structure assisted optimization of 4,5-dihydroxypyrimidine-6-carboxamide inhibitors of influenza virus endonuclease. *Scientific Reports*. 2017;7(1):17139. DOI: 10.1038/s41598-017-17419-6.
15. Kuvaeva E. V., Kolesnik D. A., Levshukova P. O., Kirillova E. N., Ivkin D. Yu. Evaluation of the anti-inflammatory activity of a new 1,6-dihydroxypyrimidine derivative. *Farmaciya*. 2021;70(4):44–47. (In Russ.) DOI: 10/29296/25419218-2021-04-07.
16. Kolesnik D. A., Kuvaeva E. V., Ivkin D. Yu., Levshukova P. O., Kirillova E. N., Yakovlev I. P. 1,2-Difenil-5-butil-6-okso-1,6-digidropirimidin-4-oliat natrii i sposob ego polucheniya [1,2-Diphenyl-5-butyl-6-oxo-1,6-dihydroxypyrimidine-4-olate sodium and a method for its preparation]. Patent RUS № RU 2757391 C1, 14.10.2021. Available at: https://www.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2757391&TypeFile=html. Accessed: 30.10.2021. (In Russ.)
17. Kuvaeva E. V., Kolesnik D. A., Levshukova P. O., Ivkin D. Yu., Yakovlev I. P. Synthesis and assessment of analgesic activity of a new 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydroxypyrimidin-4-olate sodium. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoy i farmacevticheskoy himii*. 2021;24(6):42–46. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2021-06-06.
18. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossii Federatsii. XIV izdaniya. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
19. United States Pharmacopeia (USP 38) and the 33th edition of the National Formulary (NF 33). 2015.

Идентификация и количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой (*Orthilia secunda*)

А. В. Лёзина*, И. И. Тернинко, М. В. Крысько

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Лёзина Алёна Владимировна. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

ORCID: А. В. Лёзина – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; М. В. Крысько – <https://orcid.org/0000-001-8166-4930>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 06.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Ортилия однобокая *Orthilia secunda* (L.) House (матка боровая) – многолетнее травянистое растение, произрастающее на территории Европы, Сибири, Малой и Средней Азии. Трава ортилии однобокой активно применяется в народной медицине в качестве диуретического, ранозаживляющего и противовоспалительного средства. Из литературных источников известно, что данное лекарственное растительное сырье (ЛРС) содержит флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, витамины, а также простые фенолы и их производные (арбутин и гидрохинон). Наличие арбутина обуславливает высокие антиоксидантные и противовоспалительные свойства растения. Но применение ортилии однобокой в официальной медицине ограничено ввиду отсутствия полной информации о химическом составе и критериев стандартизации данного вида ЛРС.

Цель. Идентификация и количественное определение арбутина хроматографическими методами в траве ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House, заготовленной в различных фитоценотических зонах.

Материалы и методы. Исследуемое ЛРС – трава ортилии однобокой – была заготовлена в различных эколого-фитоценотических зонах: в июле 2018 года заготовку производили в северной части Казахстана (р-н Кокшетау), в июле-августе 2019 года – в Пермском крае и в Тюменской области. Предварительную идентификацию арбутина и сопутствующих фенольных соединений – галловой кислоты и гидрохинона – осуществляли методом высокоеффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТХ) на приборе CAMAG с УФ-кабинетом (пластины Merck HPTLC silica gel 60 F154, 20 × 10), полуавтоматический аппликатор Linomat 5 (нанесение проб). Пробы наносили в количестве 5 мкл извлечения и 20 мкл раствора стандартного образца (СО). Элюирование пластин осуществляли в автоматической камере CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2). Установка параметров и обработка результатов осуществлялась в программе VisionCATS. Количественное определение арбутина проводили методом высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), которую осуществляли на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) по валидированной методике, приведенной в Европейской Фармакопее 10.0. Детектор диодноматричный SPD-M20A, колонка Intersil C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex, США). Обработку результатов проводили с помощью программы LabSolution. Идентификацию и количественное определение арбутина проводили в сравнении с стандартным раствором, который содержал стандартный образец арбутина ($C = 0,025$ мг/мл) и СО гидрохинона ($C = 0,0125$ мг/мл).

Результаты и обсуждение. ВЭТХ-анализ позволил обнаружить арбутин и галловую кислоту – основной продукт гидролитического расщепления/предшественник биосинтеза танинов гидролизуемой группы – в траве ортилии однобокой из разных мест произрастания. ВЭЖХ-анализ демонстрирует различный хроматографический профиль травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах. Однако во всех изучаемых объектах было подтверждено отсутствие гидрохинона и присутствие веществ, которые предположительно можно отнести к его производным, что подтверждается визуальным подобием спектров этих соединений и близостью экстремумов. Установлено, что арбутин не относится к маркерным (мажоритарным) соединениям ортилии. Его содержание невелико и достигает максимума (около 0,021 %) в траве ортилии однобокой, произрастающей на территории Казахстана, в то время как в траве ортилии, заготовленной на территории Пермского края арбутин идентифицирован не был. Из полученных данных следует, что наибольшее накопление арбутина происходит на территориях с более теплым и сухим климатом (северная часть Казахстана).

Заключение. ВЭТХ анализ травы ортилии однобокой позволил идентифицировать арбутин и галловую кислоту (основной предшественник танинов гидролизуемой группы). Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах, позволяют говорить о количественных различиях в содержании арбутина в зависимости от региона произрастания. Из данных эксперимента следует, что ортилия, произрастающая в северной части Казахстана накапливает максимальное (0,021 %) количество арбутина, в сравнении с образцами, заготовленными в РФ. При этом ортилия заготовленная в Пермском крае арбутин не накапливает. Не подтверждено (методами ВЭТХ и ВЭЖХ) наличие гидрохинона, следовательно, говорить о гидролитическом расщеплении арбутина в процессе биосинтеза или сушки не обоснованно. Однако во всех изучаемых объектах присутствуют пики веществ со схожими гидрохинону спектральными характеристиками, что дает возможность предположить присутствие его дериватов. Следовательно, позиционировать арбутин в качестве маркерного соединения ортилии, заготовленной на территории РФ, и проводить стандартизацию сырья по данному соединению не целесообразно.

Ключевые слова: ортилия однобокая, фенольные соединения, арбутин, высокоэффективная жидкостная хроматография, гидрохинон

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

Вклад авторов. И. И. Тернинко и А. В. Лёзина участвовали в планировании и составлении дизайна эксперимента, проведении ВЭТХ-анализа, обработке и систематизации данных, полученных в ходе эксперимента. Вышеуказанные авторы принимали участие в написании статьи. М. В. Крысько проводила ВЭЖХ-анализ и участвовала в обсуждении полученных результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Лёзина А. В., Тернинко И. И., Крысько М. В. Идентификация и количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой (*Orthilia secunda*). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):122-128. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-122-128](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-122-128).

Identification and Quantitative Determination of Arbutin in the Herb of *Orthilia secunda*

Alyona V. Lezina*, Inna I. Terninko, Marina V. Krysko

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Alyona V. Lezina. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

ORCID: Alyona V. Lezina – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; Marina V. Krysko – <https://orcid.org/0000-001-8166-4930>.

Received: 20.10.2021

Revised: 06.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. *Orthilia secunda* (L.) House is a perennial herb that grows in Europe, Siberia, Asia Minor and Central Asia. The herb of *Orthilia secunda* is actively used in folk medicine as a diuretic, wound-healing and anti-inflammatory agent. From literary sources it is known that this medicinal plant raw material (PRM) contains flavonoids, tannins, organic acids, vitamins, as well as simple phenols and their derivatives (arbutin and hydroquinone). The presence of arbutin is responsible for the plant's high antioxidant and anti-inflammatory properties. But the use of *Orthilia secunda* in official medicine is limited due to the lack of complete information on the chemical composition and criteria for standardization of this type of medicinal product.

Aim. Identification and quantification of arbutin by chromatographic methods in *Orthilia secunda* (L.) House, harvested in various phytocenotic zones.

Materials and methods. The investigated medicinal plant material – the herb of *Orthilia secunda* – was harvested in various phytocenotic zones: in July 2018, harvesting was carried out in the northern part of Kazakhstan (Kokshetau district), in July-August 2019 in the Perm Territory and in the Tyumen Region. Preliminary identification of arbutin and related phenols – gallic acid and hydroquinone – was carried out by high performance thin layer chromatography (HPTLC) on a CAMAG instrument with a UV cabinet (Merck HPTLC silica gel 60 F154 plates, 20 × 10), semi-automatic Linomat 5 applicator (sample application). Elution of the plates was performed in a CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2). Image fixation was performed on a CAMAG Scanner 3 spectrodensitometer. The quantitative determination of arbutin was carried out by the method of high-performance liquid chromatography, which was carried out on a Prominence LC-20 device (Shimadzu, Japan) according to the validated method described in the European Pharmacopoeia 10.0. Diode array detector SPD-M20A, column Intersil C18 column (250–4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, USA). The results were processed using the LabSolution software. The identification and quantification of arbutin was carried out in comparison with a standard solution containing a reference sample (RS) of arbutin (C = 0,025 mg/ml) and RS of hydroquinone (C = 0,0125 mg/ml).

Results and discussion. HPTLC analysis made it possible to detect arbutin and gallic acid – the main product of hydrolytic degradation/precursor of the biosynthesis of tannins of the hydrolysable group – in the herb of *Orthilia secunda* from different places of growth. HPLC analysis demonstrates a different chromatographic profile of *Orthilia* herb harvested in different phytocenotic zones. However, in all studied objects, the absence of hydroquinone and the presence of substances that can presumably be attributed to its derivatives were confirmed, which is confirmed by the visual similarity of the spectra of these compounds and the proximity of the extrema. It was found that arbutin does not belong to the marker (majority) compounds of *Orthilia*. Its content is low and reaches a maximum (about 0,021 %) in the herb of *Orthilia secunda* growing on the territory of Kazakhstan, while in the herb of *Orthilia* harvested in the Perm Territory arbutin was not identified. From the data obtained, it follows that the greatest accumulation of arbutin occurs in areas with a warmer and drier climate (northern part of Kazakhstan).

Conclusion. HPTLC analysis of the herb *Orthilia secunda* allowed the identification of arbutin and gallic acid (the main precursor of tannins of the hydrolysable group). The results of HPLC analysis of *Orthilia* herb harvested in various phytocenotic zones suggest quantitative differences in the content of arbutin depending on the region of growth. From the experimental data, it follows that *Orthilia* growing in the northern part of Kazakhstan accumulates the maximum (0,021%) amount of arbutin, in comparison with the samples harvested in the Tyumen region and the Perm region. At the same time, *Orthilia* harvested in the Perm Territory does not accumulate arbutin. The presence of hydroquinone has not been confirmed (by HPTLC and HPLC methods); therefore, it is not justified to talk about the hydrolytic cleavage of arbutin in the process of biosynthesis or drying. However, in all studied objects there are peaks of substances with spectral characteristics like hydroquinone, which makes it possible to assume the presence of its derivatives. Therefore, it is not advisable to position arbutin as a marker compound of *Orthilia secunda* harvested on the territory of the Russian Federation, and to standardize raw materials for this compound.

Keywords: *Orthilia secunda*, phenolic compounds, arbutin, high performance liquid chromatography, hydroquinone

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. Inna I. Terninko and Alyona V. Lezina participated in the planning and design experiment, HPTLC analysis, processing and systematization of data obtained during the experiment. The above authors took part in writing the article. Marina V. Krysko performed HPLC analysis and participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Lezina A. V., Terninko I. I., Krysko M. V. Identification and quantitative determination of arbutin in the herb of *Orthilia secunda*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):122-128. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-122-128](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-122-128)

ВВЕДЕНИЕ

Ортилия однобокая – многолетнее травянистое растение, принадлежащее семейству Вересковые (*Ericaceae*). Широко распространено на территории Европы, Западной и Восточной Сибири, в Малой и Средней Азии [1]. Местообитание – сухие хвойные леса, реже растение произрастает в смешанных и лиственных массивах [2]. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) ортилии однобокой – трава, заготовка происходит в период плодоношения (конец июля-август), поскольку в это время происходит максимальное накопление главных групп БАВ (флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, фенольные соединения) [3, 4].

Ортилия однобокая (матка боровая) активно используется в народной медицине для лечения заболеваний женской репродуктивной сферы [5]. Существуют данные о ее противовоспалительных, ранозаживляющих и гемостатических свойствах [6–8]. Применяют для лечения воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), бесплодия, дисменореи и эндометриоза (ЭМ). На фармацевтическом рынке представлена в виде биологически активных добавок (БАД). Широкий спектр фармакологического действия обусловлен комплексом БАВ, в основном фенольной структуры. Из литературных источников [4] известно, что ортилия однобокая содержит в своем составе арбутин, однако, точные данные о его количественном содержании отсутствуют. Сообщается [9, 18] о противовоспалительном, антиоксидантном [10, 11], отбеливающим кожу [12, 13] и антибактериальном [14] действии арбутина. Учитывая, что антиоксидантная активность ЛР в последнее время приобретает все большее значение [15], арбутин как индивидуальное соединение широко применяется в медицине и косметической промышленности. На данный момент одним из основных источников получения арбутина является ЛРС [16].

Цель работы – идентификация и количественное определение арбутина хроматографическими методами в траве ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House, заготовленной в различных фитоценотических зонах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служило воздушно-сухое ЛРС – трава ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House, заготовленная в трех эколого-фитоценотических зонах. В августе 2018 года заготовку ортилии однобокой осуществляли на севере Казахстана (район Kokшетау). В июле 2019 года заготавливали в Пермском крае, в конце июля-августе 2019 года в Тюменской области.

Предварительную идентификацию арбутина и сопутствующих фенольных соединений – галловой кислоты и гидрохинона – осуществляли методом высокочастотной хроматографии (ВЭТХ).

на приборе CAMAG с УФ-кабинетом (пластины Merck HPTLC silica gel 60 F154, 20 × 10). Пробы извлечений наносили полуавтоматическим аппликатором Linomat 5. Элюировали пластины в автоматической камере CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2). Установка параметров и обработка результатов осуществлялась в программе VisionCATS.

В качестве испытуемых растворов использовали водно-спиртовые извлечения (экстрагент спирт этиловый 70 %). Около 2,0 (точная навеска) измельченной травы (размер частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия 7 мм) помещали в круглодонную колбу со шлифом, экстрагировали этанолом 70 % в соотношении 1:4 с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение часа. Затем колбу охлаждали и извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Процесс экстрагирования повторяли. Водно-спиртовые извлечения объединяли, отстаивали в холодильнике 24 часа, после чего отфильтровывали.

Растворы стандартных образцов (СО) арбутина ($C = 5$ мг/мл) (аналитический стандартный образец, партия №3-SYQ-69-1, годен до 10.2021, Sigma Aldrich), галловой кислоты ($C = 2$ мг/мл) (сертифицированный стандартный образец, TraceCERT®, партия № BCCC0553, годен до 11.2021, Sigma Aldrich) и гидрохинона ($C = 2,5$ мг/мл) (вторичный фармацевтический стандартный образец, партия № SA00340113, годен до 06.202, Sigma Aldrich) готовили растворением в этаноле 96% (х.ч., Гатчинский спиртовый завод, номер паспорта МЦ0000001338, бессрочный).

На хроматографическую пластину наносили по 5 мкл исследуемых извлечений и по 20 мкл растворов СО. Развитие хроматограмм осуществляли в системе этилацетат:муравьиная кислота:вода (88:6:6). Прохождение фронта составило 90 %. Идентификацию пятен на хроматограмме осуществляли в фильтрованном УФ-свете при 254 и 366 нм. Сравнивали показатели удерживания (R_f), окраску, размер и форму пятна.

Количественное определение арбутина проводили методом высокочастотной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) по валидированной методике, приведенной в Европейской Фармакопее 10.0 [17]. Детектор диодноматричный SPD-M20A, колонка Intersil C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex, США). Температура термостата колонки 30 °C, объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока элюента 1,2 мл/мин. Подвижная фаза (ПФ) – метанол:вода (10:90). Регистрация поглощения осуществлялась при длине волны 280 нм. Обработку результатов проводили с помощью программы LabSolution.

Пробоподготовка

Около 5,0 грамм (точная навеска) порошка травы ортилии помещали в круглодонную колбу на 100 мл. Добавляли 25 мл воды очищенной и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Колбу охлаждали, фильтровали через ват-

ный тампон. После фильтрования ватный тампон помещали в колбу к остатку порошка и добавляли новую порцию 25 мл воды очищенной. Экстракцию повторяли. Новую порцию экстракта охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтраты объединяли, доводили водой очищенной в мерной колбе до 50,0 мл. 1,0 мл полученного извлечения с помощью автоматического дозатора (диапазон 100–1000 мкл, дискретность 5 мкл, Финляндия, BIONIT) помещали в мерную колбу на 25,0 мл, доводили водой очищенной до метки и тщательно перемешивали.

В качестве стандартного раствора использовали смесь растворов СО арбутина и гидрохинона.

Раствор СО арбутина: 50,0 мг арбутина (аналитический стандартный образец, партия № 3-SYQ-69-1, годен до 10.2021, Sigma Aldrich) растворяли в ПФ в мерной колбе на 50,0 мл и доводили до метки ПФ.

Раствор СО гидрохинона: 2,5 мг гидрохинона (вторичный фармацевтический стандартный образец, партия № SA00340113, годен до 06.202, Sigma Aldrich) растворяли в ПФ в мерной колбе на 10 мл и доводили до метки ПФ.

К 5,0 мл раствора СО гидрохинона прибавляли 2,5 мл раствора СО арбутина и доводили до объема 10,0 мл ПФ (раствор А).

1,0 мл раствора А помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили ПФ до метки (раствор В).

Хроматографируют последовательно стандартный раствор 5 раз и испытуемый раствор 3 раза.

Проводили 3 параллельных определения арбутина в траве ортилии.

Идентификацию арбутина на хроматограммах испытуемого раствора проводили по времени удерживания в сравнении с хроматограммами стандартного раствора, а также путем сопоставления спектров отдельных пиков и спектра пика арбутина в стандартном растворе.

Расчет количественного содержания (Х) арбутина (%) проводили по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_{CO} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2,5 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_2 \cdot a_1 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 10 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_{CO} \cdot 62,5 \cdot P}{S_2 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где S_1 – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора; S_2 – площадь пика арбутина на хроматограмме стандартного раствора; a_1 – навеска ЛРС, г; a_{CO} – навеска СО арбутина, г; P – содержание основного вещества арбутина в СО, %; W – влажность ЛРС, %.

Испытания проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматограммы идентификации отдельных фенольных соединений и их гликозидов методом ВЭТСХ приведены на рисунке 1.

Предварительная хроматографическая идентификация фенольных соединений позволила обнаружить арбутин и галловую кислоту – основной продукт гидролитического расщепления / предшественник биосинтеза танинов гидролизуемой группы – в траве ортилии однобокой из разных мест произрастания. Гидрохинон в траве ортилии идентифицирован не был.

Результаты ВЭЖХ анализа приведены на рисунках 2–3 и в таблице 1.

Хроматограммы испытуемых растворов, приведенные на рисунке 2, демонстрируют различный хроматографический профиль травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах.

Однако во всех изучаемых объектах было подтверждено отсутствие гидрохинона. Пики веществ с высокой интенсивностью, которые лежат в диапазоне 37,5–50,0 минут (время выхода СО гидрохинона – 46,2 мин) предположительно относятся к различным (метилированным или гликозилированным) производным гидрохинона. Необходимо отметить, что спектры данных соединений (рисунок 4) визуально схожи и имеют близкие, но различные максимумы, что дает возможность позиционировать их как соединения с родственной структурой. Однако данная гипотеза нуждается в подтверждении посредством выделе-

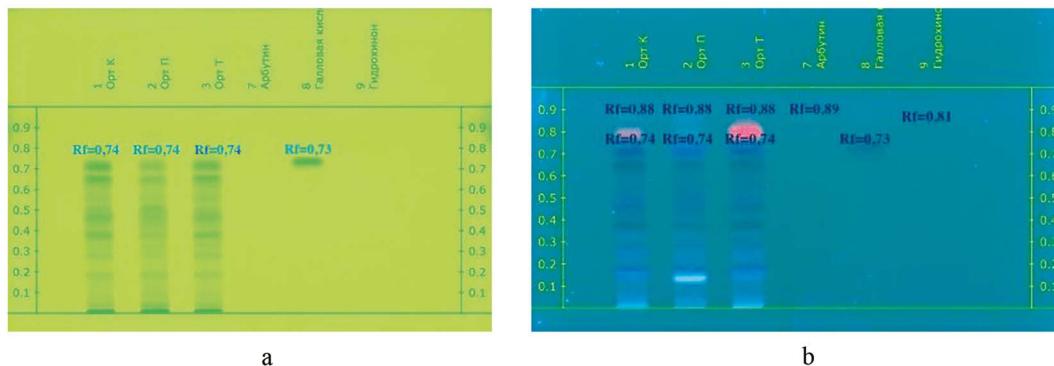


Рисунок 1. ВЭТСХ-анализ фенольных соединений (детекция а – при $\lambda = 254$ нм, б – при $\lambda = 366$ нм)

Figure 1. HPTLC analysis of phenolic compounds (detection a – at $\lambda = 254$ nm, b – at $\lambda = 366$ nm)

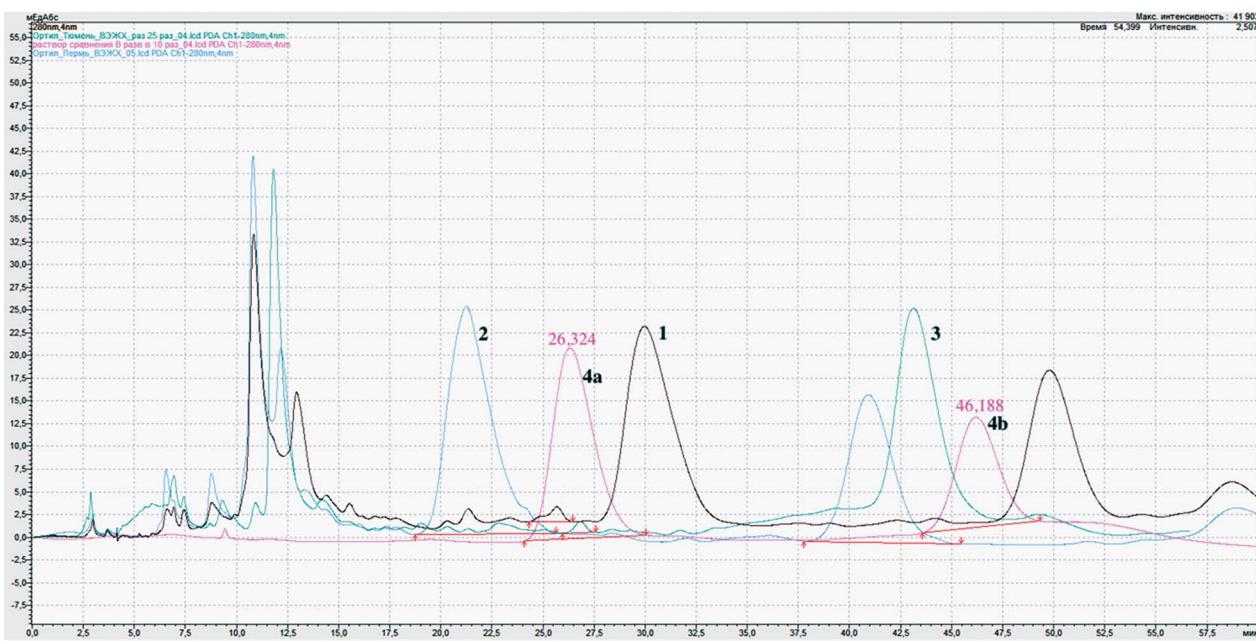


Рисунок 2. Хроматограммы извлечений из травы ортилии однобокой, заготовки:

1 – Казахстан, 2 – Пермский край, 3 – Тюменская область и стандартного раствора 4 (а-абутин, б-гидрохинон)

Figure 2. Chromatograms of extracts from the herb of Orthilia secunda harvested in:

1 – Kazakhstan, 2 – Perm region, 3 – Tyumen region and a standard solution 4 (a- arbutin, b- hydroquinone)

ния индивидуальных соединений и установления их структуры.

Пики веществ на хроматограммах, несмотря на удовлетворительный фактор асимметрии (0,8–1,2), имеют большую ширину, что может говорить о неудовлетворительной сорбционной способности и не-

обходимости корректирования (в части ПФ) фармацевтической методики. Также необходимо отметить, что пик с высокой интенсивностью на хроматограмме испытуемого раствора травы ортилии, заготовленной в Казахстане, с временем удерживания 29,97 мин имеет спектр с максимумами поглощения, характерными

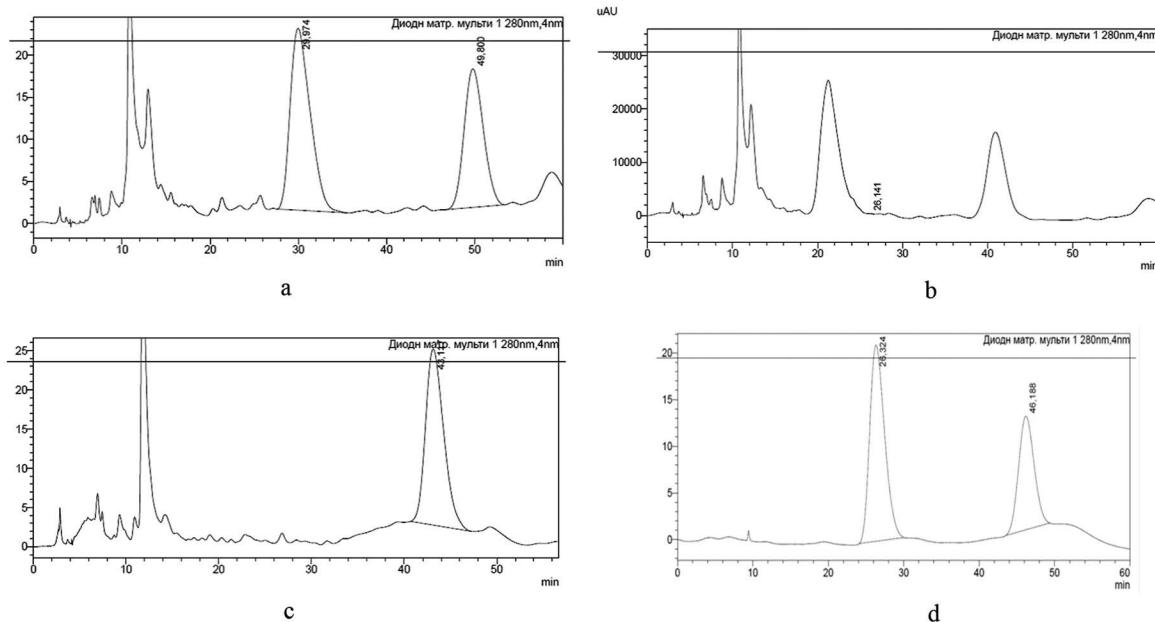


Рисунок 3. Хроматограммы испытуемых растворов травы ортилии заготовленной в различных регионах.

а – Казахстан; б – Пермь; в – Тюмень; и стандартного раствора В (д)

Figure 3. Chromatograms of the tested solutions of Orthilia secunda herb harvested in different regions.

а – Kazakhstan; б – Perm; в – Tyumen; and standard solution B (д)

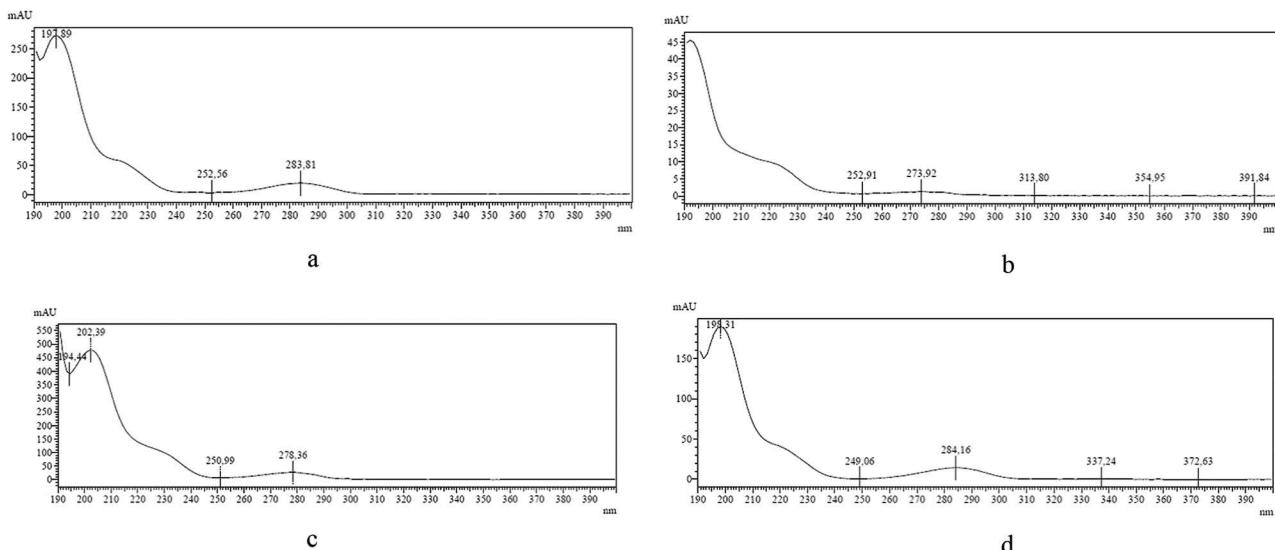


Рисунок 4. УФ-спектры отдельных пиков на хроматограммах испытуемых растворов травы ортилии, заготовленной.

а – Казахстан (пик с tR 49,80); б – Пермь (пик с tR 40,93); в – Тюмень (пик с tR 43,12) и пика гидрохинона в стандартном растворе (д)

Figure 4. UV spectra of individual peaks on the chromatograms of the tested solutions of Orthilia herb harvested.

а – Kazakhstan (peak with tR 49,80); б – Perm (peak with tR 40,93); в – Tyumen (peak with tR 43, 12) and the peak of the hydroquinone in standard solution (д)

для арбутина ($\lambda = 220$ и 284 нм), что может говорить об очень близкой химической структуре данного соединения.

Таблица 1. Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии однобокой

Table 1. Results of HPLC-analysis of Orthilia secunda

Трава ортилии однобокой заготовленной в регионе Orthilia secunda grass harvested in the region	Время удерживания пика арбутина, мин Retention time of the peak of arbutin, min	Площадь пика арбутина Arbutin peak area	Содержание арбутина, % (n = 3, P = 0,95) Arbutin content, % (n = 3, P = 0,95)
Казахстан Kazakhstan	25,67	89786	0,021 ± 0,001
Пермский край Perm Krai		не идентифицирован not identified	
Тюменская область Tyumen Oblast	26,84	47460	0,011 ± 0,001

Примечание. Площадь пика арбутина на хроматограмме СО – 2900921.

Время удерживания арбутина на хроматограмме раствора сравнения – 26,32.

Note. Arbutin peak area on the SS chromatogram – 2900921.

The retention time of arbutin on the chromatogram of the reference solution is 26.32.

Установлено, что арбутин не относится к маркерным (мажоритарным) соединениям ортилии. Его содержание невелико и достигает максимума (около 0,02 %) в траве ортилии однобокой, произрастающей на территории Казахстана, в то время как в траве ор-

тилии, заготовленной на территории Пермского края арбутин идентифицирован не был. Гипотеза о гидролизе арбутина не подтверждена исследованием, т. к. в извлечениях не идентифицирован гидрохинон – агликон арбутина, который образуется в процессе гидролитического расщепления. Из полученных данных следует, что наибольшее накопление арбутина происходит на территориях с более теплым и сухим климатом (северная часть Казахстана), в то время как на территории Российской Федерации арбутина накапливается в минимальных количествах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЭТСХ анализ травы ортилии однобокой позволил идентифицировать арбутин и галловую кислоту (основной предшественник танинов гидролизуемой группы). Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии, заготовленной в различных фитоценотических зонах, позволяют говорить о количественных различиях в содержании арбутина в зависимости от региона произрастания. Из данных эксперимента следует, что ортилия, произрастающая в северной части Казахстана накапливает максимальное (0,021 %) количество арбутина, в сравнении с образцами, заготовленными в Тюменской области. При этом ортилия заготовленная в Пермском крае арбутин не накапливает. Не подтверждено (методами ВЭТСХ и ВЭЖХ) наличие гидрохинона, следовательно, говорить о гидролитическом расщеплении арбутина в процессе биосинтеза или сушки не обоснованно. Однако во всех изучаемых объектах присутствуют пики веществ со схожими гидрохинону спектральными характеристиками, что дает возможность предположить присутствие его дериватов.

Следовательно, позиционировать арбутин в качестве маркерного соединения ортилии, заготовленной на территории РФ, и проводить стандартизацию сырья по данному соединению не целесообразно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beatty G. E., Provan J. Comparative phylogeography of two related plant species with overlapping ranges in Europe, and the potential effects of climate change on their intraspecific genetic diversity. *BMC Evolutionary Biology*. 2011;11(1):29. DOI: 10.1186/1471-2148-11-29.
2. Устенова Г. О. Правила сбора, заготовки и хранения лекарственного растения ортилии однобокой (*Orthilia secunda*). *Вестник КазНМУ*. 2018;1:345–347.
3. Ботоева Е. А., Убеева И. П., Николаев С. М. Оценка фармакотерапевтической эффективности сухого экстракта ортилии однобокой. *Acta Biomedica Scientifica*. 2009;2:40–41.
4. Ботоева Е. А. О химико-фармакологической характеристике фитосредств, использованных для экспериментальной фармакотерапии повреждений матки. *Вестник БГУ. Медицина и фармация*. 2011;12:147–153.
5. Ломбоева С. С., Танхава Л. М., Олейников Д. Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House). *Химия растительного сырья*. 2008;2:65–68.
6. Фадеева Н. И. Сравнительная оценка эффективности разных фитопрепаратов, содержащих ортилию однобокую (*Orthilia secunda*), в лечении хронического эндометрита. *Бюллетень медико-биологической науки*. 2017;7:43–46.
7. Kang S. H., Jeon Y. D., Cha J. Y. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. Extract. *BMC Complementary Altern Med*. 2018;18(1):256. DOI: 10.1186/s12906-018-2323-5.
8. Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):98–102. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
9. Tada M., Kohno M., Niwano, Y. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA. *BMC Biochemistry*. 2014;15:23. DOI: 10.1186/1471-2091-15-23.
10. Mir H., Komi E. A. D., Pouramir M. The hepatoprotective effects of *Pyrus biossieriana* buhse leaf extract on tert-butyl hydroperoxide toxicity in HepG2 cell line. *BMC Research Notes*. 2021;14:298. DOI: 10.1186/s13104-021-05713-6.
11. Pandey B. P., Pradhan S. P., Adhikari K. *Bergenia pacumbis* from Nepal, an astonishing enzymes inhibitor. *BMC Complementary Medicinal and Therapy*. 2020;20:198. DOI: 10.1186/s12906-020-02989-2.
12. Liang K., Xu K., Bessarab D. Arbutin encapsulated micelles improved transdermal delivery and suppression of cellular melanin production. *BMC Research Notes*. 2016;9:254. DOI: 10.1186/s13104-016-2047-x.
13. Hong S. Y., Lansky E., Kang S. S. A review of pears (*Pyrus* spp.), ancient functional food for modern times. *BMC Complementary Medicine and Therapy*. 2021;21:219. DOI: 10.1186/s12906-021-03392-1.
14. Trill J., Simpson C., Webley F. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments of adult female urinary tract infection (ATAFUTI): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18:421. DOI: 10.1186/s13063-017-2145-7.
15. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):59–66. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66.
16. Wang S., Fu C., Bilal M. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3. *Microbial Cell Factories*. 2018;17:174. DOI: 10.1186/s12934-018-1022-8.
17. The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. Available at: <https://pheur.edqm.eu/home>. Accessed: 18.08.2021.
18. Polouliakh N., Ludwig V., Meguro A., Kawagoe T., Heeb O., Mizuki N. Alpha-arbutin promotes wound healing by lowering ROS and upregulating insulin/igf-1 pathway in human dermal fibroblast. *Frontiers of Physiology*. 2020;4;11:586843. DOI: 10.3389/fphys.2020.586843.

REFERENCES

1. Beatty G. E., Provan J. Comparative phylogeography of two related plant species with overlapping ranges in Europe, and the potential effects of climate change on their intraspecific genetic diversity. *BMC Evolutionary Biology*. 2011;11(1):29. DOI: 10.1186/1471-2148-11-29.
2. Устенова Г. О. Rules for the collection, preparation and storage of the medicinal plant *Orthilia secunda*. *Vestnik KazNMU*. 2018;1:345–347. (In Russ.)
3. Ботоева Е. А., Убеева И. П., Николаев С. М. Evaluation of the pharmacotherapeutic efficacy of dry extract of *Orthilia secunda*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2009;2:40–41. (In Russ.)
4. Ботоева Е. А. On the chemical and pharmacological characteristics of herbal remedies used for experimental pharmacotherapy of uterine injuries. *Vestnik BGU. Meditsina i farmatsiya = The Bryansk State University Herald*. 2011;12:147–153. (In Russ.)
5. Ломбоева С. С., Танхава Л. М., Олейников Д. Н. Method for the quantitative determination of the total content of flavonoids in the aerial part of *Orthilia secunda* (L.) House. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2008;2:65–68. (In Russ.)
6. Фадеева Н. И. Comparative assessment of the effectiveness of different herbal remedies containing *Orthilia secunda* in the treatment of chronic endometritis. *Byulleten' meditsinskoy nauki = Bulletin of Medical Science*. 2017;7:43–46. (In Russ.)
7. Kang S. H., Jeon Y. D., Cha J. Y. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. Extract. *BMC Complementary Altern Med*. 2018;18(1):256. DOI: 10.1186/s12906-018-2323-5.
8. Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. HPLC-Analysis of phenolic complex in pectoral species № 4 and its dry extract. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):98–102. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
9. Tada M., Kohno M., Niwano, Y. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA. *BMC Biochemistry*. 2014;15:23. DOI: 10.1186/1471-2091-15-23.
10. Mir H., Komi E. A. D., Pouramir M. The hepatoprotective effects of *Pyrus biossieriana* buhse leaf extract on tert-butyl hydroperoxide toxicity in HepG2 cell line. *BMC Research Notes*. 2021;14:298. DOI: 10.1186/s13104-021-05713-6.
11. Pandey B. P., Pradhan S. P., Adhikari K. *Bergenia pacumbis* from Nepal, an astonishing enzymes inhibitor. *BMC Complementary Medicinal and Therapy*. 2020;20:198. DOI: 10.1186/s12906-020-02989-2.
12. Liang K., Xu K., Bessarab D. Arbutin encapsulated micelles improved transdermal delivery and suppression of cellular melanin production. *BMC Research Notes*. 2016;9:254. DOI: 10.1186/s13104-016-2047-x.
13. Hong S. Y., Lansky E., Kang S. S. A review of pears (*Pyrus* spp.), ancient functional food for modern times. *BMC Complementary Medicine and Therapy*. 2021;21:219. DOI: 10.1186/s12906-021-03392-1.
14. Trill J., Simpson C., Webley F. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments of adult female urinary tract infection (ATAFUTI): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18:421. DOI: 10.1186/s13063-017-2145-7.
15. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Determination of nettle leaves extracts antioxidant activity by various methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):59–66. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66.
16. Wang S., Fu C., Bilal M. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3. *Microbial Cell Factories*. 2018;17:174. DOI: 10.1186/s12934-018-1022-8.
17. The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. Available at: <https://pheur.edqm.eu/home>. Accessed: 18.08.2021.
18. Polouliakh N., Ludwig V., Meguro A., Kawagoe T., Heeb O., Mizuki N. Alpha-arbutin promotes wound healing by lowering ROS and upregulating insulin/igf-1 pathway in human dermal fibroblast. *Frontiers of Physiology*. 2020;4;11:586843. DOI: 10.3389/fphys.2020.586843.



Использование метода высокоеффективной тонкослойной хроматографии для обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной *Empetrum nigrum* L.

А. О. Понкратова¹, А. К. Уэйли¹, В. Г. Лужанин², Е. В. Жохова^{1*}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, д. 110

*Контактное лицо: Жохова Елена Владимировна. E-mail: elena.zhohova@pharminnotech.com

ORCID: А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Е. В. Жохова – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 03.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. В статье представлены результаты обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной *Empetrum nigrum* L. с использованием метода высокоеффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

Цель. Показать эффективность метода ВЭТСХ для проведения предварительного фитохимического исследования и определения основных групп метаболитов перспективных видов растительного сырья.

Материалы и методы. ВЭТСХ анализ выполнялся на приборе CAMAG (Швейцария), с использованием пластин MERCK HPTLC silica gel 60 F154, 20 × 10 см. Для выпаривания образцов использовался вакуумно-ротационный испаритель марки Heidolph (Германия). Надземная часть (побеги) *Empetrum nigrum* были заготовлены в районе питомника лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (далее – СПХФУ) (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования из надземной части водяники черной получали четыре фракции: гексановую, дихлорметановую, бутанольную и водную. Затем эти фракции исследовались методом ВЭТСХ в двух системах растворителей – *n*-бутанол:кислота уксусная:вода (БУВ) (4:1:2) и гексан:дихлорметан:метанол (ГДМ) (1:2:0,5). После проведения сканирующей денситометрии пластинки элюированной в системе ГДМ было выявлено, что в гексановой и дихлорметановой фракции имеют схожий состав пяты и содержат наибольшее количество соединений, по сравнению с бутанольной и водной фракцией, а в системе БУВ – что бутанольная фракция содержит наибольшее разнообразие метаболитов. После проведения УФ-спектроскопии обнаружено, что основными группами соединений, содержащихся в гексановой и дихлорметановой фракциях являются производные халконов, дигидрохалконов, бибензилов а также 9,10-дигидрофенантренов. В то время, как в бутанольной фракции основными группами вторичных метаболитов являются производные флавоноидов и танинов.

Заключение. Полученные данные позволяют отметить эффективность, экспрессность и наглядность метода ВЭТСХ для проведения предварительного фитохимического исследования и определения основных групп метаболитов перспективных видов ЛРС.

Ключевые слова: *Empetrum nigrum*, водяника черная, ВЭТСХ, вторичные метаболиты

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

Вклад авторов. А. О. Понкратова и А. К. Уэйли выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. А. О. Понкратова и Е. В. Жохова подготовили текст рукописи. В. Г. Лужанин осуществлял руководство научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Понкратова А. О., Уэйли А. К., Лужанин В. Г., Жохова Е. В. Использование метода высокоеффективной тонкослойной хроматографии для обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной *Empetrum nigrum* L. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4-1):129–137. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-129-137](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-129-137)

Using High Performance Thin Layer Chromatography for the Detection of Pharmacologically Active Secondary Metabolites in *Empetrum nigrum* L.

Anastasiia O. Ponkratova¹, Andrei K. Whaley¹, Vladimir G. Luzhanin², Elena V. Zhokhova^{1*}

¹ Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, 101, Ekaterininskaya str., Perm, 614990, Russia

*Corresponding author: Elena V. Zhokhova. E-mail: elena.zhohova@pharminnotech.com

ORCID: Anastasiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Elena V. Zhokhova – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>.

Received: 20.10.2021

Revised: 03.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. The article presents the results of the detection of pharmacologically active secondary metabolites in black crowberry *Empetrum nigrum* L. using the method of high performance thin layer chromatography (HPTLC).

Aim. To show the efficiency of HPTLC for conducting preliminary phytochemical analysis to determine the main groups of metabolites in promising medicinal plant species.

Materials and methods. HPTLC analysis was carried out on a CAMAG device (Switzerland), using MERCK HPTLC silica gel 60 F154, 20 × 10 cm plates. For the evaporation of the samples, a Heidolph vacuum rotary evaporator (Germany) was used. The aerial parts (shoots) of *Empetrum nigrum* were harvested next to St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPCPU) nursery garden of medicinal plants (Leningrad Region, Vsevolozhsky District, Priozerskoe Highway, 38 km) in August 2019.

Results and discussion. In the course of the research, four fractions from the aerial parts of *Empetrum nigrum* were obtained: hexane, dichloromethane, butanol, and water. Then, these fractions were investigated by HPTLC in two solvent systems – *n*-butanol:acetic acid:water (BAW) (4:1:2) and hexane:dichloromethane:methanol (HDM) (1:2:0.5). After scanning densitometric analysis of the plates eluted in the HDM system, it was revealed, that the hexane and dichloromethane fractions have a similar composition and contain the greatest amount of compounds, compared to the butanol and water fractions, and in the BAW system, it was found, that the butanol fraction contains the greatest variety of metabolites. As a result of UV spectroscopy, it was found, that the main groups of compounds contained in the hexane and dichloromethane fractions are derivatives of chalcones, dihydrochalcones, bibenzyls and 9,10-dihydrophenanthrenes. While in the butanol fraction, the main groups of secondary metabolites were derivatives of flavonoids and tannins

Conclusion. The data obtained allow us to note the efficiency, speed and simplicity of HPTLC for conducting preliminary phytochemical analysis to determine the main groups of metabolites of promising medicinal plant species.

Keywords: *Empetrum nigrum*, black crowberry, HPTLC, secondary metabolites

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. Anastasiia O. Ponkratova and Andrei K. Whaley performed the experimental part and processing of the results. Anastasiia O. Ponkratova and Elena V. Zhokhova took part in preparing of the article text. Vladimir G. Luzhanin supervised the research. All authors took part in the discussion of the results.

Funding. Research results were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Ponkratova A. O., Whaley A. K., Luzhanin V. G., Zhokhova E. V. Using high performance thin layer chromatography for the detection of pharmacologically active secondary metabolites in *Empetrum nigrum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):129–137. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-129-137](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-129-137)

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время метод высокоеффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) широко используется ведущими лабораториями мира для анализа лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП), диагностических добавок, биологически активных добавок к пище, продуктов питания, косметических средств, сильнодействующих средств и контроля качества производственных процессов. Общие статьи по идентификации ЛРС методом ВЭТСХ и частные монографии на ЛРС, использующие методики ВЭТСХ, включены в фармакопейный анализ США и стран Европы [1, 2–11]. Метод ВЭТСХ является высокотехнологичным. Согласно современным требованиям, процедура ВЭТСХ базируется на использовании специализированного автоматизированного оборудования, работающего в строго заданном диапазоне по стандартному протоколу. Использование современного оборудования представляет возможность сделать метод полуавтоматическим и программируемым. Идентификация с помощью метода ВЭТСХ включает в себя следующие стадии: пробоподготовка (получение извлечения из

лекарственного растительного сырья), нанесение, элюирование, дериватизация (при необходимости), оценка хроматограмм (классическая денситометрия, сканирование), документирование, обработка снимков, архивирование [12]. Основной категорией риска при проведении анализа является ручной перенос пластиинки с этапа на этап [1].

Высокоеффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) является важным инструментом для анализа однокомпонентных и многокомпонентных образцов, позволяющим работать с широким спектром соединений с высокой точностью и экономической эффективностью. В одном анализе может быть исследовано большое количество образцов за счет уменьшения размеров зон адсорбции первичной хроматограммы (диаметр пятен наносимой пробы 1–2 мм, длина полос – 5–10 мм), что значительно сокращает время проведения анализа. Кроме того, ВЭТСХ – это микрометод, так как объем наносимой пробы от 2 мкл. Использование высокоеффективных пластиинок позволяет значительно увеличить разделительную способность системы растворителей и снизить пределы обнаружения и количественного определения анализируемых веществ в 10–100 раз. Детекция прово-

дится с использованием различных длин волн, что обеспечивает получение более полного профиля исследуемого объекта. Постхроматографическая дериватизация может осуществляться разнообразными реагентами и обеспечивает одновременную обработку стандартов и образцов в одинаковых условиях [12].

В частные статьи на ЛРС Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV (ГФ) издания как метод определения основных групп биологически активных веществ включена тонкослойная хроматография, метод ВЭТСХ охарактеризован только в общей статье ГФ ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» [13, 14].

Цель данного исследования – показать эффективность метода ВЭТСХ для проведения предварительного фитохимического исследования и определения основных групп метаболитов перспективных видов растительного сырья. В качестве модельного объекта была выбрана надземная часть водяники черной *Empetrum nigrum* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВЭТСХ анализ выполнялся на приборе CAMAG (Швейцария), с использованием пластин MERCK HPTLC silica gel 60 F154, 20 × 10 см. Нанесение образцов производилось с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5. Элюирование пластин производилось с помощью автоматической камеры CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2). Изображения получали с помощью CAMAG TLC Visualizer 2. УФ-спектроскопия пятен производили на спектроденситометре CAMAG Scanner 3. Установка параметров и обработка результатов осуществлялась в программе VisionCATS. Для выпаривания образцов использовался вакуумно-ротационный испаритель марки Heidolph (Германия).

Надземная часть (побеги) *Empetrum nigrum* были заготовлены в районе питомника лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (далее – СПХФУ) (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения предварительного фитохимического анализа и определения основных групп метаболитов в растительном сырье, была проведена высокоэффективная тонкослойная хроматография в комбинации со сканирующей денситометрией и УФ-спектрометрией.

Заготовленные в Ленинградской области побеги водяники черной (*Empetrum nigrum*) высушивались в инфракрасном сушильном шкафу при 40 °C, после чего измельчались и просеивались через сито с размером отверстий 1 мм. Затем проводилась многостадийная экстракция измельченных побегов водяники черной (744 г) 96 % этиловым спиртом (3150 мл), упавшаясь на при 60 °C, до приблизительного объема 200 мл, после чего полученный экстракт подвергался последовательной исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракции [5]. На первом этапе экстракция проводилась с равным количеством гексана, до полного обесцвечивания гексана, затем к спиртовому извлечению добавляли 50 мл воды очищенной и продолжали жидкость-жидкостную экстракцию с равным количеством дихлорметана (ДХМ), данную процедуру повторяли также до полного его обесцвечивания. В заключении жидкость-жидкостная экстракция проводилась с равным количеством бутанола. Осточную водно-спиртовую (фракция 4) и три полученных фракции выпаривали до приблизительного объема 100 мл. Часть гексановой, дихлорметановой и бутанольной фракции, достаточной для анализа (5 мл), выпаривались досуха и перерастворялись в 10 мл 96 % этилового спирта (фракции 1, 2, 3 соответственно) (схема 1).

Фракции 1–4 наносились на пластины по 5 мкл (1–4 трэки, соответственно) и 10 мкл (5–8 трэки соответственно) (рисунки 1–6). После нанесения образцов пластины помещались в автоматическую камеру. Для того, чтобы охватить максимальный диапазон полярностей соединений, содержащихся в экстракте, хроматографирование проводилось в двух системах растворителей – *n*-бутанол:кислота уксусная:вода (БУВ) (4:1:2) (рисунки 1–3) и гексан:дихлорметан:метанол (ГДМ) (1:2:0,5) (рисунки 4–6). Элюирование автоматически прекращалось, когда фронт растворителя достигал 85 мм от линии старта. Условия проведения высокоэффективной тонкослойной хроматографии приведены в таблице 1.

Таблица 1. Условия проведения высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Table 1. Conditions for high performance thin layer chromatography

Номер п/п Number	Время проведения операции, мин Operation time, min	Название операции Operation name
1	1	Предварительная сушка пластины Pre-drying the plate
2	30	Насыщение камеры Chamber saturation
3	5	Прекондиционирование пластины Plate preconditioning
4	–	Элюирование пластины Elution of the plate
5	10	Сушка пластины Drying the plate

Изображение пластин получали с помощью системы CAMAG TLC Visualizer 2 в видимом и в УФ-свете при двух длинах волн (254 и 366 нм) (рисунки 1–6).



Схема 1. Схема получения фракций 1–4

Scheme 1. Scheme for obtaining fractions 1–4

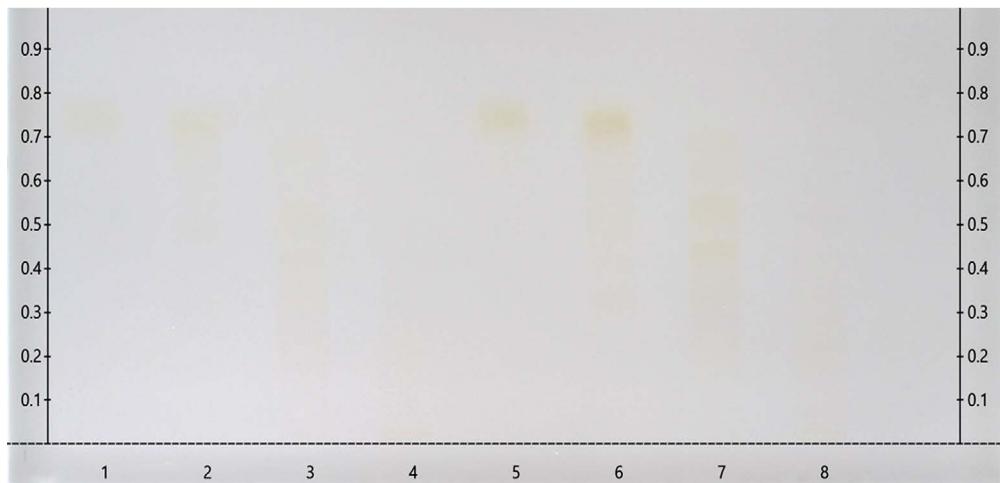


Рисунок 1. Хроматограмма полученная системе БУВ 4:1:2 (фотография в видимом свете)

Figure 1. Chromatogram obtained in the BAW 4:1:2 system (visible light picture)

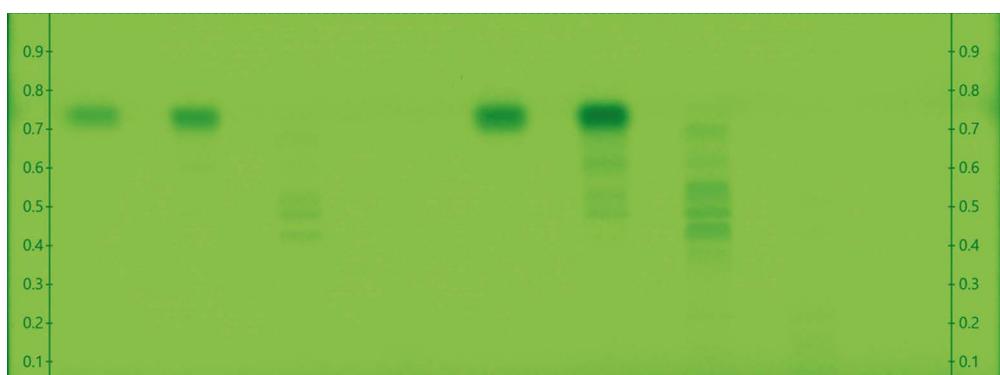


Рисунок 2. Хроматограмма полученная в системе БУВ 4:1:2 (фотография при 254 нм)

Figure 2. Chromatogram obtained in the BAW 4:1:2 system (picture at 254 nm)

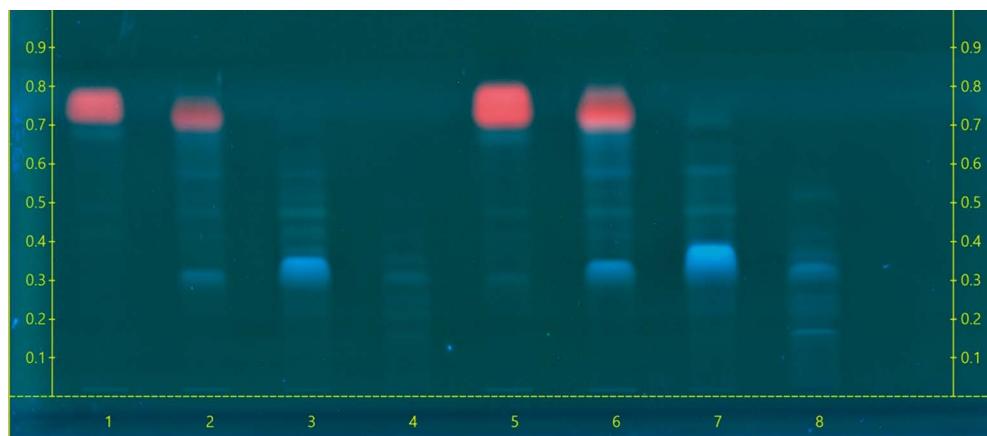


Рисунок 3. Хроматограмма полученная в системе БУВ 4:1:2 (фотография при 366 нм)

Figure 3. Chromatogram obtained in the BAW 4:1:2 system (picture at 366 nm)

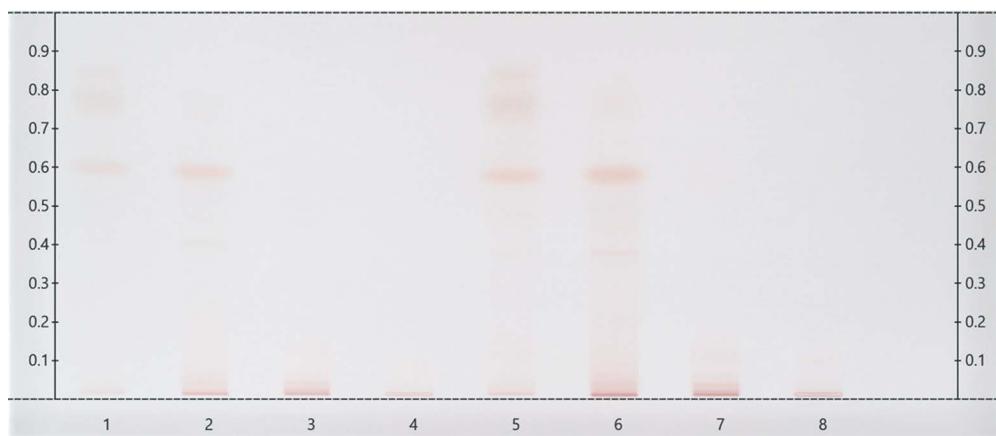


Рисунок 4. Хроматограмма полученная в системе ГДМ (1:2:0,5) (фотография в видимом свете)

Figure 4. Chromatogram obtained in the HDM system (1:2:0.5) (visible light picture)

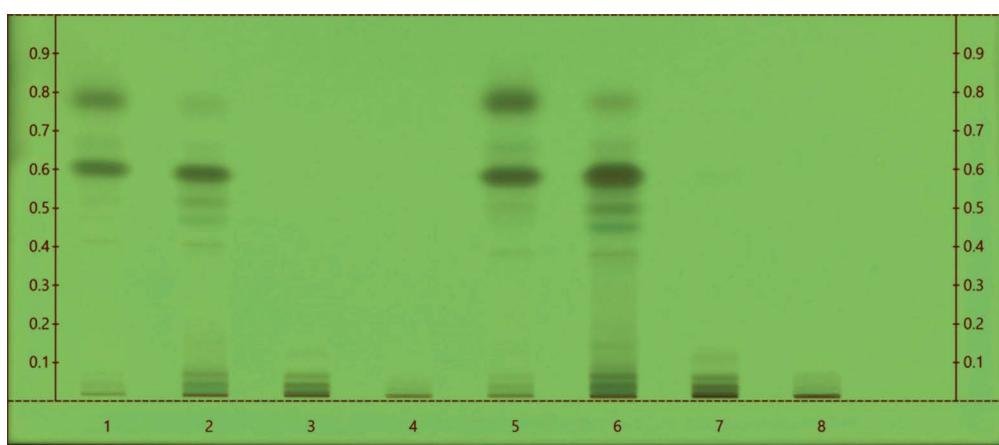


Рисунок 5. Хроматограмма полученная в системе ГДМ (1:2:0,5) (фотография при 254 нм)

Figure 5. Chromatogram obtained in the HDM system (1:2:0.5) (picture at 254 nm)

После фиксации изображений проводили сканирующую денситометрию измерением отраженного света в режиме абсорбции при 254 нм и 366 нм (рисунки 7 и 9). Параметры проведения сканирующей денситометрии приведены в таблице 2.

После проведения сканирующей денситометрии хроматограммы полученной в системе гексан:дихлорметан:метанол (1:2:0,5), проводилось сравнение денситограмм отдельных треков между собой (рисунок 8), с целью выявления фракций с похожим со-

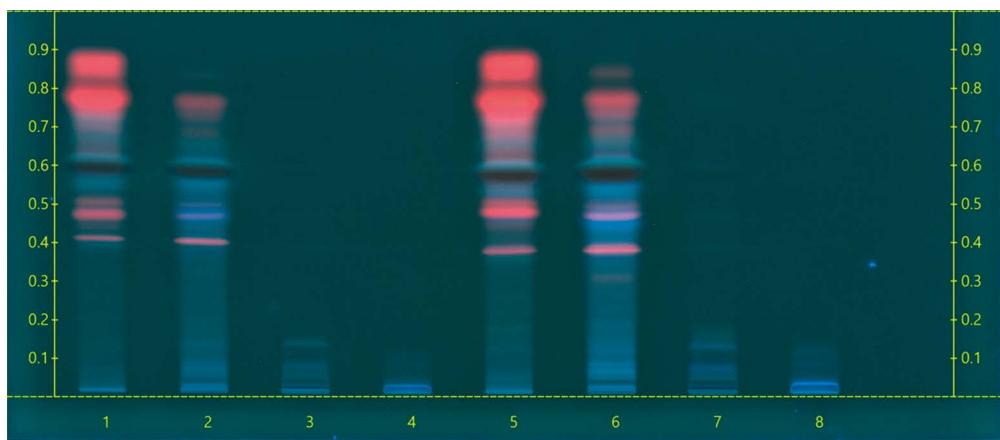


Рисунок 6. Хроматограмма полученная в системе ГДМ (1:2:0,5) (фотография при 366 нм)

Figure 6. Chromatogram obtained in the HDM system (1:2:0.5) (picture at 366 nm)

тавом пятен. В результате обработки полученных изображений, а также денситограмм, было выявлено, что гексановая и дихлорметановая фракции имеют схожий состав пятен и содержат наибольшее количество соединений, по сравнению с бутанольной и водной фракцией. Следуя из вышесказанного, УФ-спектроскопию пятен было решено проводить на треках 1 и 2.

Также аналогичным образом проводилась обработка изображений и денситограмм, снятых с хроматограммы полученной в системе БУВ (4:1:2) (рисунок 9), было выявлено что бутанольная фракция содержит наибольшее разнообразие метаболитов. УФ-спектроскопию пятен было решено проводить на треке 7.

Таблица 2. Параметры проведения сканирующей денситометрии

Table 2. Parameters of scanning densitometry

Номер п/п Number	Параметры Parameters	Показатели параметров Parameter indicators
1	Тип сканирования Scan type	Множественные λ Multiple λ
2	Используемые длины волн Wavelengths	254 нм, 366 нм 254 nm, 366 nm.
3	Режим измерения Measurement mode	Абсорбция Absorbance
4	Скорость сканирования Scanning speed	20 мм/с 20 mm/s
5	Разрешение Resolution	100 мкм 100 microns

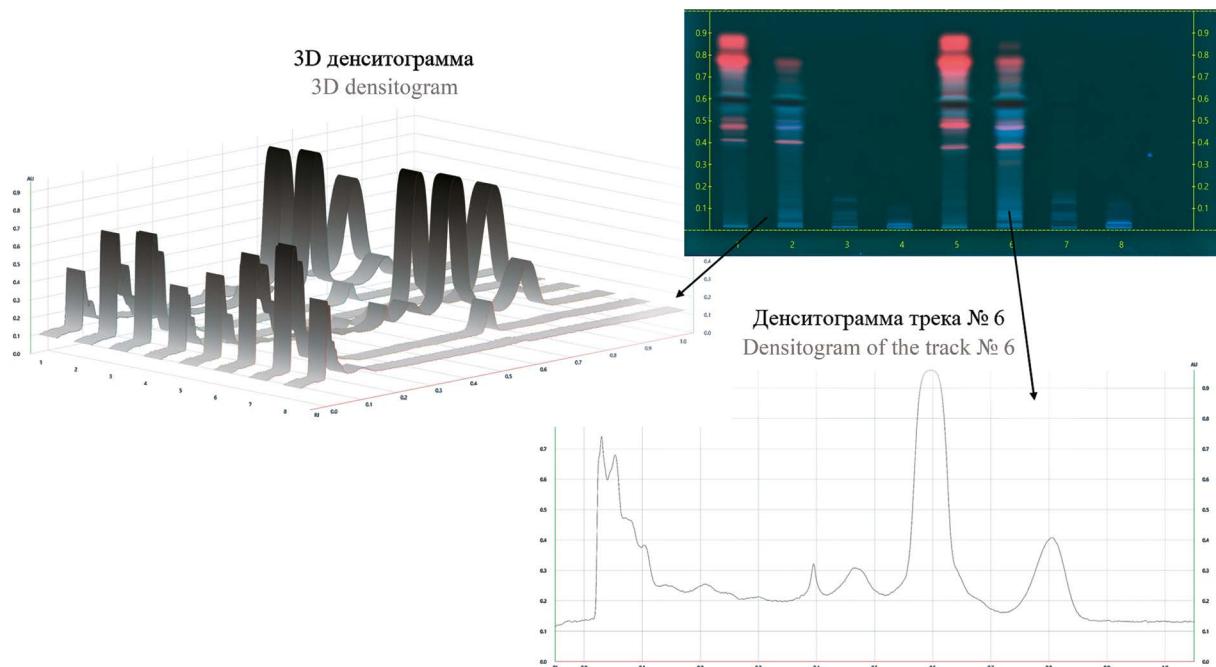


Рисунок 7. Сканирующая денситометрия (366 нм) хроматограммы, полученной в системе гексан:дихлорметан:метанол (1:2:0,5)

Figure 7. Scanning densitometry (366 nm) of a chromatogram obtained in the system hexane:dichloromethane:methanol (1:2:0.5)

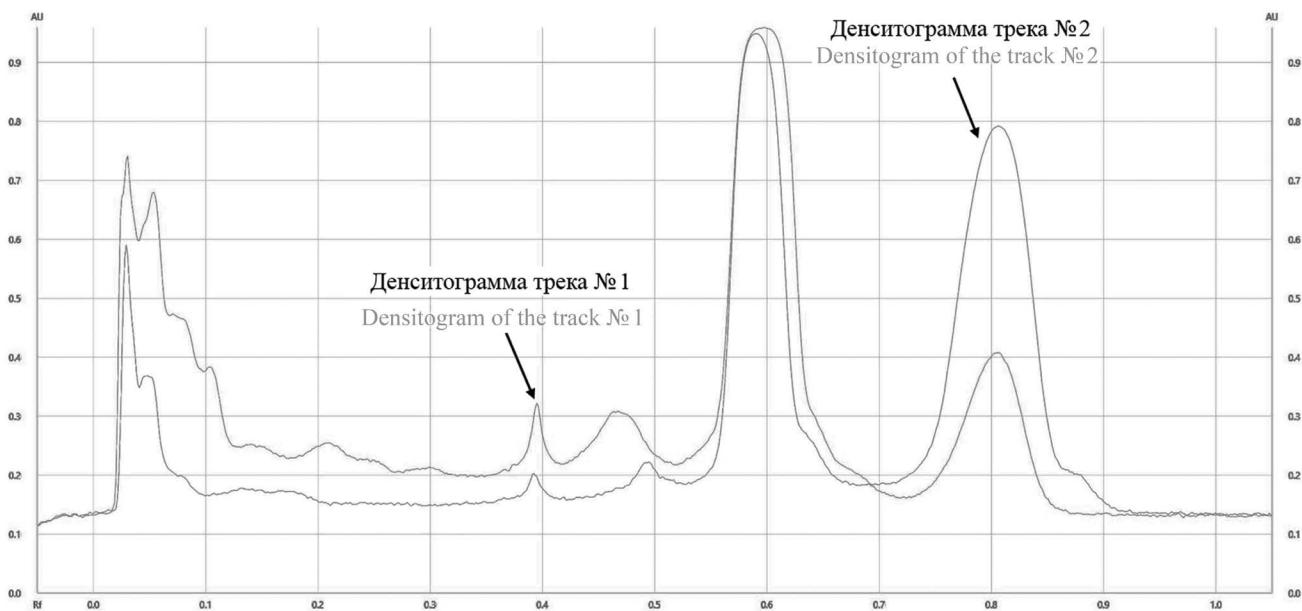


Рисунок 8. Сравнение денситограмм полученных с трека 1 и 2.

Figure 8. Comparison of densitograms obtained from tracks 1 and 2

Обработку полученных снимков производили в программном обеспечении VisionCATS. С помощью опции «Data View» определялось R_f и фиксировались R_f -метки пятен на снимках. УФ-спектроскопию пятен проводили с помощью спектроденситометра Camag Scanner 3 в режиме отражения, при скорости сканирования 20 нм/с, в диапазоне 190–450 нм (рисунок 10).

Обработка УФ-спектров производилась в базе данных природных соединений – Dictionary of Natural Products, компании Taylor & Francis Group (Великобритания), а также в сравнение с УФ-спектрами индивидуальных соединений, выделенных в предыдущих исследованиях [15–17] и литературными данными. Согласно УФ-спектрам пятен на хроматограмме, полученной в системе ГДМ (1:2:0,5) обнаружено,

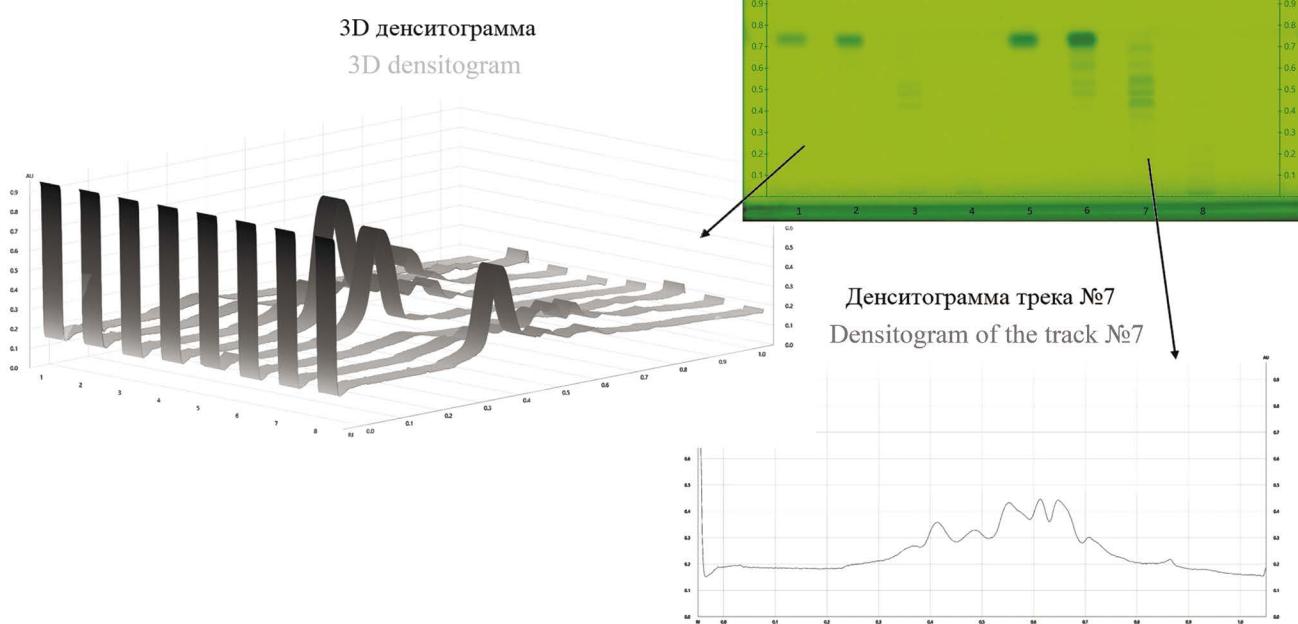


Рисунок 9. Сканирующая денситометрия (254 нм) хроматограммы, полученной в системе БУВ (4:1:2)

Figure 9. Scanning densitometry (254 nm) of the chromatogram obtained in the BAW system (4:1:2)

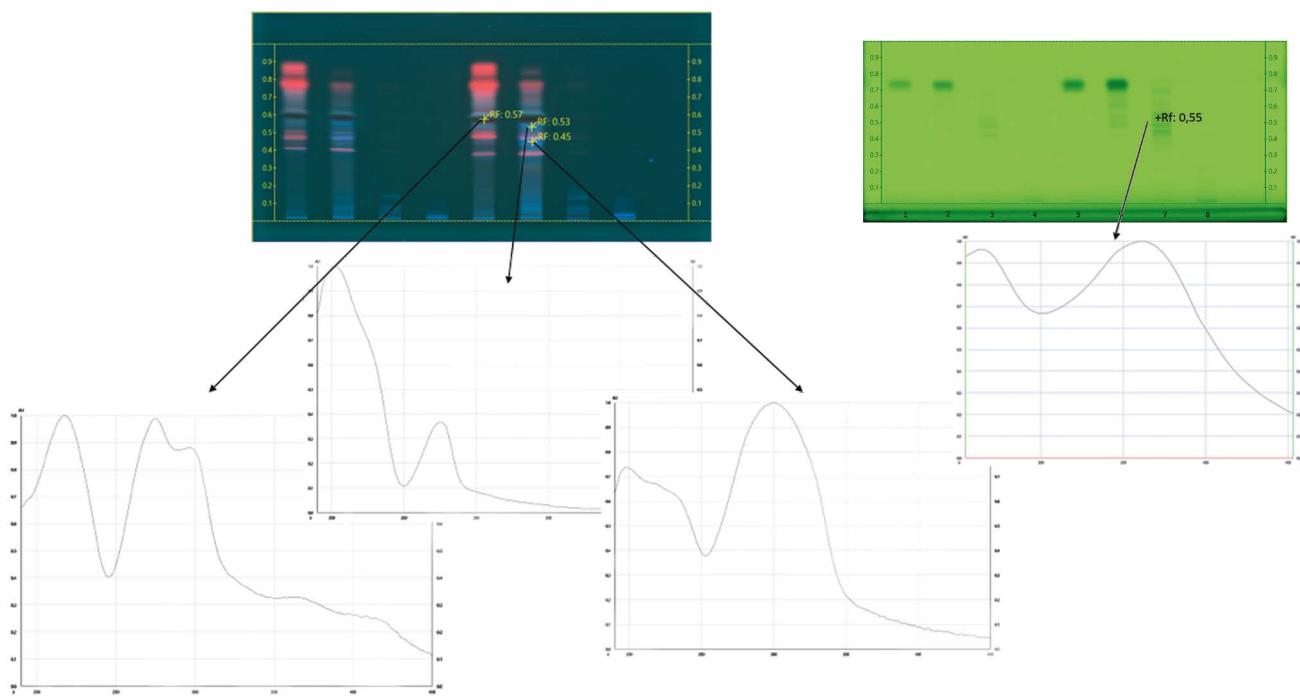


Рисунок 10. УФ-спектроскопия пятен на хроматограмме полученной в системе ГДМ (1) (1:2:0,5) и БУВ (4:1:2) (2)

Figure 10. UV spectroscopy of spots on the chromatogram obtained in the HDM system (1) (1:2:0.5) and BAW (4:1:2) (2)

что основными группами соединений, содержащихся в гексановой и дихлорметановой фракциях являются производные халконов, дигидрохалконов, бибинзилов а также 9,10-дигидрофенантренов [16–20, 21]. В то время, как в бутанольной фракции основными группами вторичных метаболитов являются производные флавоноидов и танинов [15, 22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют отметить эффективность, экспрессность и наглядность метода ВЭТСХ для проведения предварительного фитохимического исследования и определения основных групп метаболитов перспективных видов ЛРС.

ЛИТЕРАТУРА

- Хохлова Е. А. Оценка рисков при анализе лекарственного растительного сырья методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. *Вестник фармации*. 2017;76(2):43–49.
- Agatonovic-Kustrin S., Doyle E., Gegechkori V., Morton D. W. High-performance thin-layer chromatography linked with (bio) assays and FTIR-ATR spectroscopy as a method for discovery and quantification of bioactive components in native Australian plants. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2020;184:113208. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113208.
- Amirvaresi A., Rashidi M., Kamyar M., Amirahmadi M., Daraei B., Parastar H. Combining multivariate image analysis with high-performance thin-layer chromatography for development of a reliable tool for saffron authentication and adulteration detection. *Journal chromatography A*. 2020;1628:461461. DOI: 10.1016/j.chroma.
- Bruni R., Brighenti V., Caesar L. K., Bertelli D., Cech N. B., Pellati F. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used Echinacea species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;160:443–477. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.07.044.
- Avula B., Sagi S., Masoodi M. H., Bae J. Y., Wali A. F., Khan I. A. Quantification and characterization of phenolic compounds from Northern Indian propolis extracts and dietary supplements. *Journal of AOAC International*. 2020;103(5):1378–1393. DOI: 10.1093/jaoacint/qsa032.
- Ebrahimi-Najafabadi H., Kazemeini S. S., Pasdaran A., Hamed A. A novel similarity search approach for high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) fingerprinting of medicinal plants. *Phytochemical analysis*. 2019;30(4):405–414. DOI: 10.1002/pca.2823.
- Frommenwiler D. A., Kim J., Yook C. S., Tran T. T. T., Cañigueral S., Reich E. Comprehensive HPTLC fingerprinting for quality control of an herbal drug – the case of angelica gigas root. *Planta medica*. 2018;84(06/07):465–474. DOI: 10.1055/a-0575-4425.
- Khan M. I., Rahman M. A., Khalid M., Khushtar M., Mujahid M. Quality Control Standardization and evaluation of antimicrobial potential of daruhaldi (*Berberis aristata* DC) stem bark. *Journal of dietary supplements*. 2020;17(1):97–109. DOI: 10.1080/19390211.2018.1484405.
- Khokhlova K., Zdoryk O. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles. *Natural product research*. 2020;34(19):2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
- Sethuraman V., Janakiraman K., Krishnaswami V., Natesan S., Kandasamy R. Combinatorial analysis of quercetin and resveratrol by HPTLC in *Sesbania grandiflora*/phyto-based nanoformulations. *Natural product research*. 2021;35(13):2243–2248. DOI: 10.1080/14786419.2019.1662012.
- Sharma A., Katiyar C. K., Banerjee S., Chanda J., Kar A., Biswas S., Mukherjee P. K. RP-HPLC and HPTLC Methods for Analysis of Selected Herbs Used as Complexion Promoters in Ayurveda and Unani Systems of Medicine. *Journal of AOAC International*. 2020;103(3):692–698. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0290.
- Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. New York, Stuttgart. 2006. 264 p. DOI: 10.1055/B-002-66241.

13. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изданіе. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 28.10.2021.
14. Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):69–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
15. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоксианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
16. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
17. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
18. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. J. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica acta*. 1992;105:300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.TB00302.X.
19. Krasnov E. A., Ermoliva E. V., Kadyrova T. V., Raldugin V. A. Phenolic components of *Empetrum nigrum* extract and the crystal structure of one of them. *Chemistry of natural compounds*. 2000;35(5):493–496. DOI: 10.1023/A:1002887406817.
20. Jarevang T., Nilsson M-C., Wallstedt A., Odham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
21. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., Mejia E. G., Rasikin I., Lila M. N. Alaskan Wild Berry Resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(7):3884–900. DOI: 10.1021/jf902693r.
22. Määttä K. R., Kamal-Eldin A., Mattila P. H., Gonzalez-Paramas A. M., Törrönen R. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(14):4477–86. DOI: 10.1021/jf049595y.
6. Ebrahimi-Najafabadi H., Kazemeini S. S., Pasdaran A., Hamed A. A novel similarity search approach for high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) fingerprinting of medicinal plants. *Phytochemical analysis*. 2019;30(4):405–414. DOI: 10.1002/pca.2823.
7. Frommenwiler D. A., Kim J., Yook C. S., Tran T. T. T., Cañigueral S., Reich E. Comprehensive HPTLC fingerprinting for quality control of an herbal drug – the case of angelica gigas root. *Planta medica*. 2018;84(06/07):465–474. DOI: 10.1055/a-0575-4425.
8. Khan M. I., Rahman M. A., Khalid M., Khushyar M., Mujahid M. Quality Control Standardization and evaluation of antimicrobial potential of daruhaldi (*Berberis aristata* DC) stem bark. *Journal of dietary supplements*. 2020;17(1):97–109. DOI: 10.1080/19390211.2018.1484405.
9. Khokhlova K., Zdoryk O. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles. *Natural product research*. 2020;34(19):2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
10. Sethuraman V., Janakiraman K., Krishnaswami V., Natesan S., Kandasamy R. Combinatorial analysis of quercetin and resveratrol by HPTLC in *Sesbania grandiflora*/phyto-based nanoformulations. *Natural product research*. 2021;35(13):2243–2248. DOI: 10.1080/14786419.2019.1662012.
11. Sharma A., Katiyar C. K., Banerjee S., Chanda J., Kar A., Biswas S., Mukherjee P. K. RP-HPLC and HPTLC Methods for Analysis of Selected Herbs Used as Complexion Promoters in Ayurveda and Unani Systems of Medicine. *Journal of AOAC International*. 2020;103(3):692–698. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0290.
12. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. New York, Stuttgart. 2006. 264 p. DOI: 10.1055/B-002-66241.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изданіе [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
14. Тринеева О. В. Development of theoretical approaches to determination of the main groups of biologically active substances of medicinal plant raw materials by TLC method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = Drug development & registration. 2021;10(2):69–79. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
15. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = Drug development & registration. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
16. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
17. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
18. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. J. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica acta*. 1992;105:300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.TB00302.X.
19. Krasnov E. A., Ermoliva E. V., Kadyrova T. V., Raldugin V. A. Phenolic components of *Empetrum nigrum* extract and the crystal structure of one of them. *Chemistry of natural compounds*. 2000;35(5):493–496. DOI: 10.1023/A:1002887406817.
20. Jarevang T., Nilsson M-C., Wallstedt A., Odham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
21. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., Mejia E. G., Rasikin I., Lila M. N. Alaskan Wild Berry Resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(7):3884–900. DOI: 10.1021/jf902693r.
22. Määttä K. R., Kamal-Eldin A., Mattila P. H., Gonzalez-Paramas A. M., Törrönen R. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(14):4477–86. DOI: 10.1021/jf049595y.

REFERENCES

1. Hohlova E. A. Оцена риска при анализе лекарственного растительного сырья методом высокочувствительной тонкослойной хроматографии [Risk assessment in the analysis of medicinal plant materials by high-performance thin-layer chromatography]. *Vestnik farmacii*. 2017;76(2):43–49. (In Russ.)
2. Agatonovic-Kustrin S., Doyle E., Gegechkori V., Morton D. W. High-performance thin-layer chromatography linked with (bio) assays and FTIR-ATR spectroscopy as a method for discovery and quantification of bioactive components in native Australian plants. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2020;184:113208. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113208.
3. Amirvaresi A., Rashidi M., Kamyar M., Amirahmadi M., Daraei B., Parastar H. Combining multivariate image analysis with high-performance thin-layer chromatography for development of a reliable tool for saffron authentication and adulteration detection. *Journal chromatography A*. 2020;1628:461461. DOI: 10.1016/j.chroma.
4. Bruni R., Brighenti V., Caesar L. K., Bertelli D., Cech N. B., Pellati F. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used Echinacea species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;160:443–477. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.07.044.
5. Avula B., Sagi S., Masoodi M. H., Bae J. Y., Wali A. F., Khan I. A. Quantification and characterization of phenolic compounds from Northern Indian propolis extracts and dietary supplements. *Journal of AOAC International*. 2020;103(5):1378–1393. DOI: 10.1093/jaoacint/qsa032.
6. Ebrahimi-Najafabadi H., Kazemeini S. S., Pasdaran A., Hamed A. A novel similarity search approach for high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) fingerprinting of medicinal plants. *Phytochemical analysis*. 2019;30(4):405–414. DOI: 10.1002/pca.2823.
7. Frommenwiler D. A., Kim J., Yook C. S., Tran T. T. T., Cañigueral S., Reich E. Comprehensive HPTLC fingerprinting for quality control of an herbal drug – the case of angelica gigas root. *Planta medica*. 2018;84(06/07):465–474. DOI: 10.1055/a-0575-4425.
8. Khan M. I., Rahman M. A., Khalid M., Khushyar M., Mujahid M. Quality Control Standardization and evaluation of antimicrobial potential of daruhaldi (*Berberis aristata* DC) stem bark. *Journal of dietary supplements*. 2020;17(1):97–109. DOI: 10.1080/19390211.2018.1484405.
9. Khokhlova K., Zdoryk O. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles. *Natural product research*. 2020;34(19):2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
10. Sethuraman V., Janakiraman K., Krishnaswami V., Natesan S., Kandasamy R. Combinatorial analysis of quercetin and resveratrol by HPTLC in *Sesbania grandiflora*/phyto-based nanoformulations. *Natural product research*. 2021;35(13):2243–2248. DOI: 10.1080/14786419.2019.1662012.
11. Sharma A., Katiyar C. K., Banerjee S., Chanda J., Kar A., Biswas S., Mukherjee P. K. RP-HPLC and HPTLC Methods for Analysis of Selected Herbs Used as Complexion Promoters in Ayurveda and Unani Systems of Medicine. *Journal of AOAC International*. 2020;103(3):692–698. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0290.
12. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. New York, Stuttgart. 2006. 264 p. DOI: 10.1055/B-002-66241.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изданіе [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
14. Тринеева О. В. Development of theoretical approaches to determination of the main groups of biologically active substances of medicinal plant raw materials by TLC method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = Drug development & registration. 2021;10(2):69–79. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
15. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = Drug development & registration. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
16. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
17. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
18. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. J. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica acta*. 1992;105:300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.TB00302.X.
19. Krasnov E. A., Ermoliva E. V., Kadyrova T. V., Raldugin V. A. Phenolic components of *Empetrum nigrum* extract and the crystal structure of one of them. *Chemistry of natural compounds*. 2000;35(5):493–496. DOI: 10.1023/A:1002887406817.
20. Jarevang T., Nilsson M-C., Wallstedt A., Odham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
21. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., Mejia E. G., Rasikin I., Lila M. N. Alaskan Wild Berry Resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(7):3884–900. DOI: 10.1021/jf902693r.
22. Määttä K. R., Kamal-Eldin A., Mattila P. H., Gonzalez-Paramas A. M., Törrönen R. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(14):4477–86. DOI: 10.1021/jf049595y.

Сравнительный фитохимический анализ образцов надземной части *Empetrum nigrum* L., собранных в различных регионах РФ, как перспективного источника фармакологически активных вторичных метаболитов

А. О. Понкратова^{1*}, А. К. Уйэли¹, Е. В. Жохова¹, Е. А. Безверхняя^{2,3}, В. Г. Лужанин⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

⁴ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, д. 110

*Контактное лицо: Понкратова Анастасия Олеговна. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; А. К. Уйэли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Е. В. Жохова – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>;

Е. А. Безверхняя – <https://orcid.org/0000-0001-7699-5719>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 03.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. В ряде исследований показано, что различные генетические факторы и факторы окружающей среды могут влиять на биосинтез и накопление вторичных метаболитов. В частности, известно, что местный геоклимат и сезонные его изменения, прочие внешние условия, такие как свет, температура, влажность и химический состав почвы оказывают влияние на химический состав и, как следствие, на терапевтические свойства экстрактивных комплексов растений, используемых в медицинской практике. *Empetrum nigrum* L. (водяника чёрная) является источником разнообразных фармакологически активных вторичных метаболитов – халкононов, дигидрохалкононов, бибензилов, 9,10-дигидрофенантренов, флавоноидов, а также проантоцианидинов. В научной литературе отсутствуют данные о вариации химического состава *E. nigrum* в зависимости от региона произрастания. Полученные данные являются необходимыми для обоснованного выбора места заготовки объекта с целью проведения дальнейших химико-фармакологических исследований для разработки перспективных лекарственных кандидатов.

Цель. Провести сравнительный анализ состава вторичных метаболитов образцов надземной части *E. nigrum*, собранных в различных регионах Российской Федерации.

Материалы и методы. Для изучения состава вторичных метаболитов использовали образцы, собранные в трех различных географических точках: образец 1 собран в окрестностях питомника лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в июле 2020 года, образец 2 собран на Кольском полуострове, в районе горного массива Хибины в июле 2020 года, образец 3 собран на полуострове Камчатка, в районе Халактырского пляжа (побережье Тихого Океана) в июле 2020 года. Установление состава вторичных метаболитов проводили методом аналитической высокочастотной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором.

Результаты и обсуждение. В результате данного исследования впервые были установлены значительные вариации качественного химического состава образцов надземной части *E. nigrum*, произрастающих в различных регионах Российской Федерации. Образец 3, собранный на полуострове Камчатка, по сравнению с прочими образцами содержит наибольшее разнообразие полярных вторичных метаболитов, относящихся к классам флановоидов, танинов и фенолкарбоновых кислот, в то время как в образце 1, собранном в Ленинградской области, мажорными соединениями являются слабополярные соединения, а в образце 2, собранном в горном массиве Хибины, обнаружено наименьшее качественное содержание вторичных метаболитов. Данная вариабельность химического состава могут быть обусловлены различным воздействием факторов окружающей среды (биотическими и абиотическими).

Заключение. Впервые проведено сравнение ВЭЖХ-профилей образцов надземной части *E. nigrum*, собранных в различных регионах РФ. В результате установлена значительная вариация состава вторичных метаболитов в исследуемых образцах в зависимости от места и условий произрастания. Полученные данные могут быть использованы для обоснованного выбора места заготовки объекта с целью проведения дальнейших химико-фармакологических исследований для разработки перспективных лекарственных кандидатов.

Ключевые слова: *Empetrum nigrum*, водяника чёрная, ВЭЖХ-профайлинг, 9,10-дигидрофенантрены, бибензилы, халконы, дигидрохалкононы, флавоноиды, вторичные метаболиты

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

Вклад авторов. А. О. Понкратова, А. К. Уйэли и Е. А. Безверхняя выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. Е. В. Жохова принимала участие в заготовке исследуемых образцов. В. Г. Лужанин осуществлял руководство научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Понкратова А. О., Уйэли А. К., Жохова Е. В., Безверхняя Е. А., Лужанин В. Г. Сравнительный фитохимический анализ образцов надземной части *Empetrum nigrum* L., собранных в различных регионах РФ, как перспективного источника фармакологически активных вторичных метаболитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):138–145. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-138-145](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-138-145)

Comparative Phytochemical Analysis of the Aerial Parts of *Empetrum nigrum* L. Samples, Collected in Various Regions of the Russian Federation

Anastasiia O. Ponkratova^{1*}, Andrei K. Whaley¹, Elena V. Zhokhova¹,
Ekaterina A. Bezverkhniaia^{2,3}, Vladimir G. Luzhanin⁴

¹ Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

² Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

³ National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin pr., Tomsk, 634050, Russia

⁴ Perm State Pharmaceutical Academy, 101, Ekaterininskaya str., Perm, 614990, Russia

*Corresponding author: Anastasiia O. Ponkratova. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: Anastasiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>;
Elena V. Zhokhova – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>; Ekaterina A. Bezverkhniaia – <https://orcid.org/0000-0001-7699-5719>;
Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Received: 20.10.2021 Revised: 03.12.2021 Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. A number of studies have shown that various genetic and environmental factors can affect the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites. In particular, it is known that the local geoclimate, seasonal changes, external conditions such as light, temperature, moisture and soil fertility can affect the chemical composition and, as a result, the therapeutic properties of plants used in the pharmaceutical and food industries. *Empetrum nigrum* L. is a rich source of various pharmacologically active secondary metabolites – chalcones, dihydrochalcones, bibenzyls, 9,10-dihydrophenanthrenes, flavonoids, and proanthocyanidins. In the scientific literature, there is no data on the variation in the chemical composition of *E. nigrum* depending on the growing area. The obtained data are necessary for a reasonable choice of the collecting location for the plant, with the aim of its further chemical and pharmacological research for the development of promising drug candidates.

Aim. To carry out a comparative analysis of secondary metabolites composition in the aerial parts of *Empetrum nigrum* growing in different regions of the Russian Federation.

Materials and methods. Samples collected in three different areas were used to compare HPLC profiles: sample 1 was collected next to SPCPU nursery garden of medicinal plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozerskoe highway, 38 km) in July 2020, sample 2 was collected on the Kola Peninsula, around the Khibiny mountains in July 2020, sample 3 was collected on the Kamchatka Peninsula, next to Khalaktyrsky beach (Pacific Ocean coast) in July 2020. Extracts were analyzed by analytical high performance liquid chromatography (HPLC) using a Prominence LC-20 device (Shimadzu, Japan) equipped with a diode array detector.

Results and discussion. As a result of the research, for the first time, a significant variation in the qualitative chemical composition in the aerial parts of *Empetrum nigrum* growing in different regions of Russian Federation was established. Sample 3, collected on the Kamchatka Peninsula, in comparison with samples 1 and 2, contain the greatest variety of polar secondary metabolites belonging to the classes of flavonoids, tannins, and phenol carboxylic acids, while in the shoots collected in the Leningrad region, the major metabolites were weakly polar compounds belonging to the classes of chalcones, dihydrochalcones, bibenzyls, and 9,10-dihydrophenanthrenes, and in sample 2, collected in the Khibiny mountains, the lowest qualitative content of secondary metabolites was found. This variation may be caused by various environmental factors (biotic and abiotic).

Conclusion. For the first time, the comparison of HPLC profiles of aerial part samples of *E. nigrum*, collected in different regions of the Russia Federation has been carried out. As a result, significant variations in the secondary metabolites composition of the studied samples were established, depending on the regions and growing conditions of the plants. The data obtained can be used for a reasonable choice of the collection location for the plant, with the aim of its further chemical and pharmacological research for the development of promising drug candidates.

Keywords: black crowberry, *Empetrum nigrum*, HPLC-profiling, 9,10-dihydrophenanthrene, bibenzyls, chalcones, dihydrochalcones, flavonoids, secondary metabolites

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. Anastasiia O. Ponkratova, Andrei K. Whaley and Ekaterina A. Bezverkhniaia performed the experimental part and processing of the results. Elena V. Zhokhova took part in the collecting of the researched samples. Vladimir G. Luzhanin supervised the research. All authors took part in the discussion of the results.

Funding. Research results were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Ponkratova A. O., Whaley A. K., Zhokhova E. V., Bezverkhniaia E. A., Luzhanin V. G. Comparative phytochemical analysis of the aerial parts of *Empetrum nigrum* L. samples, collected in various regions of the Russian Federation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):138–145. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-138-145](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-138-145)

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день наблюдается тенденция широкого применения лекарственных средств растительного происхождения, преимущества которых заключаются в низкой токсичности и лучшей переносимости в широком диапазоне доз [1, 2]. Несомненный интерес представляют растения рода

Empetrum, широко применяемые в традиционной медицине Сибири, Дальнего Востока и Тибета для лечения судорожных состояний и нейродегенеративных заболеваний [3].

Наличие разнообразных классов вторичных метаболитов в составе *E. nigrum* обуславливает уникальность и комплексность фармакологического

воздействия. Так, экспериментально были установлены противосудорожный, церебропротекторный, антиоксидантный и антирадикальный, противогрибковый, противомикробный и противовоспалительный эффекты флаваноидсодержащих и халконсодержащих экстрактивных комплексов из водяники черной [4–8].

Водяника черная (*Empetrum nigrum* L.) представляет собой вечнозеленый кустарничек, относящийся к семейству *Ericaceae*. Ареал произрастания *E. nigrum* охватывает практически всю северную часть России, Японию, Китай, а также северные европейские страны (Скандинавские страны и Великобританию). К типичным местообитаниям данного вида относятся сфагновые болота, мохово-лишайниковые тундры и заболочиваемые хвойные леса [9]. В предыдущих исследованиях сообщалось об обнаружении и выделении из *E. nigrum* разнообразных классов вторичных метаболитов, среди которых наиболее представительными классами являются халконы и дигидрохалконы, бибензилы, 9,10-дигидрофенантрены [10–13], а также проантоцианидины типа А [14, 15] и флавоноиды [16].

Вторичные метаболиты лекарственных растений являются материальной основой их фармакологического воздействия. Однако процессы синтеза и накопления вторичных метаболитов очень сложны и подвержены влиянию многочисленных факторов. В ряде исследований показано, что различные генетические факторы и факторы окружающей среды могут влиять на биосинтез и накопление вторичных метаболитов [17–19]. В частности, известно, что местный геоклимат и сезонные его изменения, прочие внешние условия, такие как свет, температура, влажность и химический состав почвы оказывают влияние на химический состав и, как следствие, на терапевтические свойства растений, используемых в медицине [20]. Например, было показано, что изменение количества и сезонности осадков влияют на концентрацию цианогенных гликозидов [21], а повышение концентрации CO_2 часто приводит к увеличению концентрации конденсированных танинов. В научной литературе отсутствуют данные о вариабельности химического состава *E. nigrum* в зависимости от региона произрастания. Полученные данные являются необходимыми для обоснованного выбора места заготовки объекта с целью проведения дальнейших химико-фармакологических исследований для разработки перспективных лекарственных кандидатов.

Таким образом, целью настоящего исследования был сравнительный анализ состава вторичных метаболитов образцов надземной части *E. nigrum*, собранных в различных регионах Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения состава вторичных метаболитов использовали образцы, собранные в трех различных географических точках: образец 1 собран в окрест-

ностях питомника лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в июле 2020 года, образец 2 собран на Кольском полуострове, в районе горного массива Хибины в июле 2020 года, образец 3 собран на полуострове Камчатка, в районе Халактырского пляжа (побережье Тихого Океана) в июле 2020 года. Установление состава вторичных метаболитов проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором, при 235 нм. Применялась хроматографическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (25 см × 4,6 мм) с размером частиц 5 мкм. Объем ввода пробы – 10 мкл. Температура анализа – 40 °С. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1 %, по объему. Характеристика метода ВЭЖХ-анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика метода ВЭЖХ-анализа

Table 1. Method parameters of HPLC analysis

Время (мин) Time (min)	Скорость потока (мл/мин) Flow rate (ml/min)	Концентрация компонента А (%) Concentration of A (%)	Концентрация компонента В (%) Concentration of B (%)
0,01	1,00	95	5
5,00	1,00	95	5
45,75	1,00	0	100
50,00	1,00	0	100
60,00	1,00	95	5
65,00	1,00	95	5

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения ВЭЖХ-профилей изучаемых образцов *E. nigrum* были получены их этианольные экстракты. Перед экстракцией сырье подвергалось воздушно-теневой сушке, измельчалось и просеивалось через сито с диаметром отверстий 1 мм. Для получения этианольных экстрактов, отвешивали по 10 г каждого образца и экстрагировали 96 % этиловым спиртом (100 мл). Экстракцию проводили в герметично закрытых стеклянных колбах при комнатной температуре в течение 72 часов. После экстракции экстракты фильтровали через бумажный фильтр, измеряли объем полученных экстрактов, и, при необходимости, доводили объем экстракта до 100 мл соответствующим растворителем. Затем отбирались по 0,5 мл пробы каждого экстракта для проведения ВЭЖХ-анализа. В результате были получены хроматограммы (рисунки 1, 2 и 3).

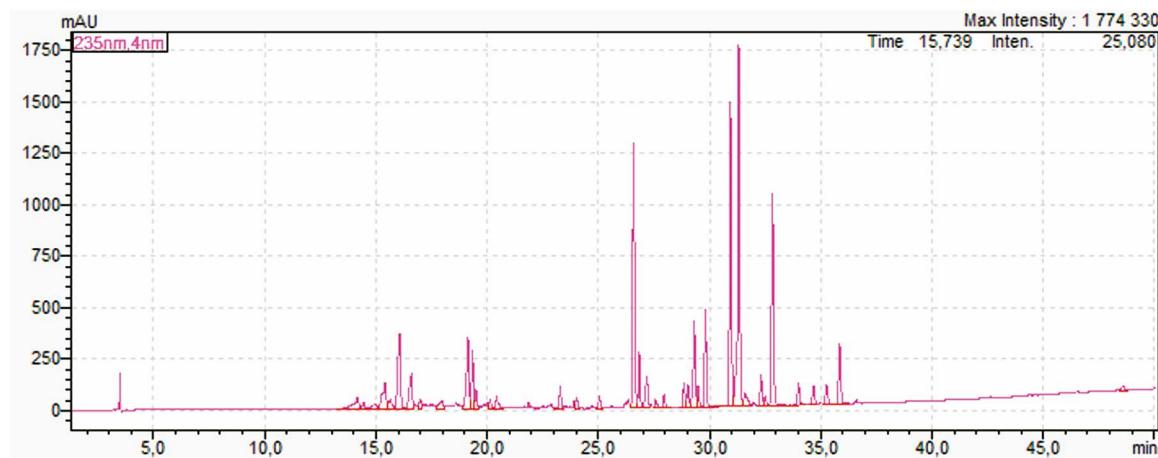


Рисунок 1. ВЭЖХ-УФ хроматограмма этанольного экстракта, полученного из побегов *Empetrum nigrum*, собранных в Ленинградской области (образец 1)

Figure 1. HPLC-UV data of ethanolic extract obtained from shoots of *Empetrum nigrum* growing in Leningrad region (Sample 1)

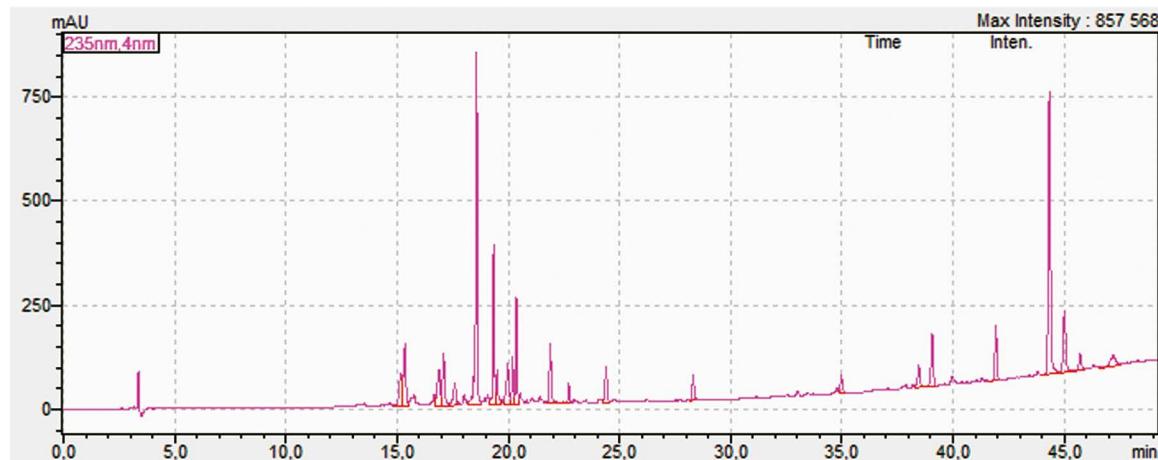


Рисунок 2. ВЭЖХ-УФ хроматограмма этанольного экстракта, полученного из побегов *Empetrum nigrum*, собранных на Кольском полуострове (образец 2)

Figure 2. HPLC-UV data of ethanolic extract obtained from shoots of *Empetrum nigrum* growing in Kola Peninsula (Sample 2)

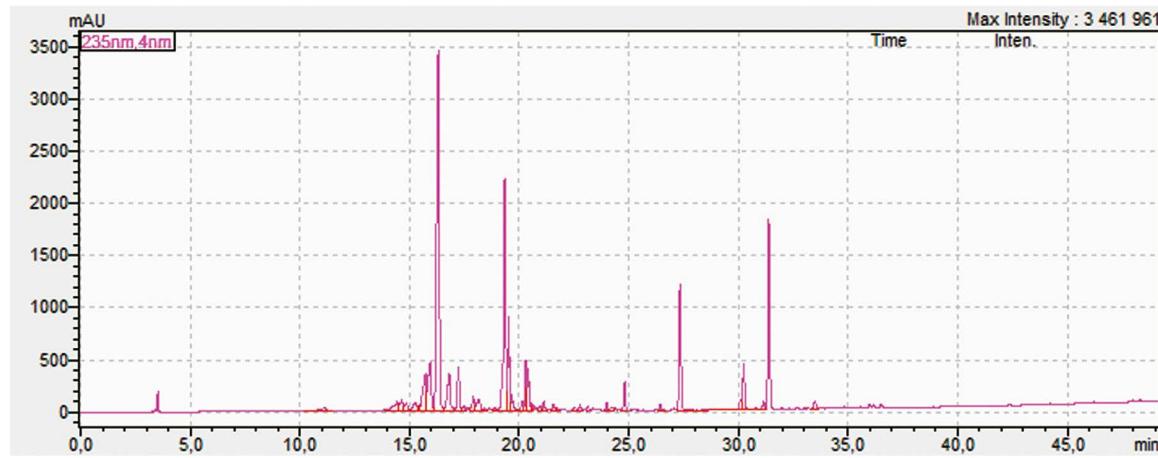


Рисунок 3. ВЭЖХ-УФ хроматограмма этанольного экстракта, полученного из побегов *Empetrum nigrum*, собранных на полуострове Камчатка (образец 3)

Figure 3. HPLC-UV data of ethanolic extract obtained from shoots of *Empetrum nigrum* growing in Kamchatka Peninsula (Sample 3)

Полученные хроматограммы сравнивались с хроматограммами стандартных образцов (СО) рутина, кверцетина, гиперозида, цинарозида, кемферола, мирицетина, лютеолина, вератровой, синаповой, протокатеховой, хлорогеновой, кофейной, розмариновой и сиреневой кислот, а также с хроматограммами индивидуальных соединений, выделенных из *Empetrum nigrum*, структура которых была установлена в предыдущих исследованиях [10, 11, 14]. Идентификацию пиков проводили путем сравнения хроматографических параметров (время удерживания и максимумы УФ-поглощения) (таблица 2).

Пики мирицетина и лютеолина, а также вератровой, синаповой, протокатеховой и розмариновой кислот в исследуемых образцах обнаружены не были.

Данные, приведенные в таблице 2, показывают значительную вариабельность химического состава образцов, собранных в различных регионах РФ. Наибольшее количество вторичных метаболитов было обнаружено в образце 3, собранном на полуострове Камчатка, однако наибольшая их часть представляет собой полярные соединения (29), относящиеся преимущественно к классам флавоноидов (14), танинов (7) и фенолкарбоновых кислот (5). Также установлено наличие 10 менее полярных соединений с временем удерживания от 23 до 40 минут, из которых идентифицировано 8 соединений, относящихся к классам халконов (1), дигидрохалконов (2), 9,10-дигидрофенантренов (3) и бибиензилов (2) (таблица 2, рисунок 3).

В образце 2, собранном на Кольском полуострове, было обнаружено 23 соединения, из которых 5 удалось идентифицировать. Основная часть вторичных метаболитов (13) представляет собой полярные соединения, относящиеся преимущественно к классам флавоноидов (5), танинов (4) и фенолкарбоновых кислот (2). Кроме того, было установлено наличие 5 менее полярных соединений с временем удерживания от 23 до 40 минут, а также наличие 5 неполярных соединений с временем удерживания более 40 минут (таблица 2, рисунок 2).

В образце 1, собранном в Ленинградской области, было установлено наличие 37 соединений, из которых 24 удалось идентифицировать. Преобладающей группой вторичных метаболитов (23) являются слабо полярные соединения с временем удерживания от 23 до 40 минут, относящиеся к классам бибиензилов, 9,10-дигидрофенантренов, халконов и дигидрохалконов, в то время как полярные соединения с временем удерживания до 23 минут представлены в меньшей степени (14) и относятся к классам танинов (6), флавоноидов (5) и фенолкарбоновых кислот (3) (таблица 2, рисунок 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено сравнение ВЭЖХ-профилей образцов надземной части *E. nigrum*, собранных в различных регионах РФ. В результате установлена значительная вариация состава вторичных метаболи-

тов в исследуемых образцах в зависимости от региона и условий произрастания.

Данная вариабельность может быть обусловлена различным воздействием факторов окружающей среды (биотическими и абиотическими). Вероятно, данное различие может быть связано преимущественно с температурным фактором. В ряде исследований по изучению влияния температуры на накопление флавоноидов, было показано, что при более высоких температурах (30–35 °C) накопление флавоноидов уменьшается. Также фактором влияющим на накопление флавоноидов в растениях является разница дневной и ночной температур. В исследовании было показано, что при разности дневной/ночной температур более 10 и более градусов, накопление флавоноидов уменьшается [22].

Климат восточной части п-ова Камчатка сочетает в себе черты морского и муссонного, со среднегодовой температурой +2,8 °C, благодаря влиянию Курило-Камчатского течения и Тихого океана температура зимой редко опускается ниже –19 °C, в тоже время летом редко поднимается выше +15 °C, а перепад температур день/ночь не достигает 10 °C. Вероятно данные температурные условия обуславливают наибольшее разнообразие полярных вторичных метаболитов в образце 3, относящихся к классам флавоноидов, танинов и фенолкарбоновых кислот, по сравнению с другими образцами.

В тоже время, климат в горном массиве Хибины является суровым субарктическим, средняя годовая температура составляет около –3 °C, где июль – самый жаркий месяц, со средней температурой 13 °C, а перепад температур день/ночь может достигать 15 °C. Вероятно, именно из-за низкой среднегодовой температуры, достаточно короткого холодного лета и большого перепада температуры день/ночь, качественный состав надземной части водяники наиболее беден по сравнению с остальными образцами, но также, как и образец 3 приставлен преимущественно классами флавоноидов, танинов и фенолкарбоновых кислот.

Климат в Ленинградской области умеренный, со средней годовой температурой +5,8 °C, самый жаркий месяц – июль, со средней суточной температурой +19,5 °C, самый холодный февраль со средней температурой –5,8 °C. Перепад температур день/ночь в Ленинградской области может достигать 15 °C в различные месяцы, чем вероятно можно объяснить меньшее качественное содержание флавоноидов, танинов и фенолкарбоновых кислот, по сравнению с образцом 3. Однако, образец 1 богат слабо полярными соединениями, относящиеся к классам халконов, дигидрохалконов, бибиензилов и 9,10-дигидрофенантренов, отсутствующими в образцах 2 и 3.

Полученные данные могут быть использованы для обоснованного выбора места заготовки объекта для проведения дальнейших химико-фармакологических исследований для разработки перспективных лекарственных кандидатов.

Таблица 2. Сравнение состава вторичных метаболитов образцов 1, 2 и 3

Table 2. Comparison of secondary metabolites composition of the samples 1, 2 and 3

Номер п/п Number	Название СО / Индивидуального соединения Name of reference compound / Individual compound	Хроматографические параметры (время удерживания, мин; максимумы УФ-поглощения, нм) Chromatographic parameters (retention time, min; UV-absorption maxima, nm)	Образец 1 Sample 1	Образец 2 Sample 2	Образец 3 Sample 3
1	Рутин Rutin	19,1; 254, 351	+	-	+
2	Кверцетин Quercetin	23,9; 254, 370	+	-	+
3	Кемпферол Kaempferol	20,0; 265, 346	+	-	+
4	Цинарозид Cynaroside	19,6; 253, (266), 347	-	-	+
5	Гиперозид Hyperoside	19,3; 254, 352	+	+	+
6	Сиреневая кислота Syringic acid	16,0; 273	+	-	-
7	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid	15,1; 232, (284) 326	+	+	+
8	Кофеиновая кислота Caffeic acid	15,4; 233, (290), 232	+	+	+
9	Процианидин А1 Procyanidin A1	18,3; 278	+	-	-
10	Процианидин А2 Procyanidin A2	19,4; 277	+	+	+
11	Эпикатехин-(2β → O → 5, 4β → 6)-catechin Epicatechin-(2β → O → 5, 4β → 6)-catechin	20,2; 278	+	+	-
12	1-(3-гидроксифенил)-2-(3-гидрокси- 4,5-диметоксифенил) этиан 1-(3-hydroxyphenyl)-2-(3-hydroxy- 4,5-dimethoxyphenyl) ethane	25,1; 273, 325	+	-	+
13	1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифе- нил)-2-фенилэтан 1-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)- 2-phenyl ethane	27,2; 268, (327)	+	-	+
14	1-(3,5-дигидрокси- 4-метоксифенил)-2- (3-гидроксифенил) этиан 1-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)- 2-(3-hydroxyphenyl) ethene	23,4; 272, (324)	+	-	-
15	2,3,4,7-тетраметокси- 9,10-дигидрофенантрен 2,3,4,7-tetramethoxy- 9,10-dihydrophenanthrene	34,9; 283, (300)	+	-	-
16	2,3,4-триметокси-5-гидрокси- 9,10-дигидрофенантрен 2,3,4-trimethoxy-5-hydroxy- 9,10-di-hydrophenanthrene	33,0; 275, (296)	+	-	+
17	4,7-дигидрокси-2,3-диметокси- 9,10-дигидрофенантрен 4,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy- 9,10-dihydrophenanthrene	26,4; (238), 280	+	-	+
18	6-гидрокси-2,3,4-триметокси- 9,10-дигидрофенантрен 6-hydroxy-2,3,4-trimethoxy- 9,10-dihydrophenanthrene	28,3; 282	+	-	+
19	4'-гидрокси- 2'-метоксидигидрохалкон 4'-hydroxy- 2'-methoxydihydrochalcone	29,4; 268, 303	+	-	+

Номер п/п Number	Название СО / Индивидуального соединения Name of reference compound / Individual compound	Хроматографические параметры (время удерживания, мин; максимумы УФ-поглощения, нм) Chromatographic parameters (retention time, min; UV-absorption maxima, nm)	Образец 1 Sample 1	Образец 2 Sample 2	Образец 3 Sample 3
20	2'-гидрокси- 4'-метоксидигидрохалкон 2'-hydroxy- 4'-methoxydihydrochalcone	35,4; 274, 314	+	-	-
21	2',4'-диметоксидигидрохалкон 2',4'-dimethoxydihydrochalcone	34,2; 267, 302	+	-	-
22	2',4'-дигидроксидигидрохалкон 2',4'-dihydroxydihydrochalcone	31,2; 276, 313	+	-	+
23	2'-гидрокси-4'-метоксихалкон 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone	36,0; 341	+	-	-
24	2',4'-дигидроксихалкон 2',4'-dihydroxychalcone	31,2; 339	+	-	+
	Идентифицировано пиков Identified peaks		24	5	16
	Всего пиков Total peaks:		37	23	39

ЛИТЕРАТУРА

- Сокуренко М. С., Соловьева Н. Л. Технологии повышения стабильности полифенольных соединений в лекарственных препаратах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;4:92–91.
- Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганапольский В. П., Ятманов А. Н., Шабанов П. Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(2):56–63. DOI: 10.17816/RCF15256-63
- Барнаулов О. Д. Сравнительная оценка церебропротективных и других фармакологических свойств растений семейства шикшевые *Empetraceae*. *Традиционная медицина*. 2018;1(52):38–47.
- Huttunen S., Toivanen M., Arkko S., Ruponen M., Tikkkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytotherapy Research*. 2011;25(1):122–127. DOI: 10.1002/ptr.3240.
- Kim K. C., Lee I. K., Kang K. A., Kim B. J., Kim D., Moon J. Y., Yoo B. S., Hyun J. W. *Empetrum nigrum* var. *japonicum* extract suppresses γ -ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(11):161–170. DOI: 10.1142/S0192415X11008725.
- Nohynek L. J., Alakomi H. L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K. M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1):18–32. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_4.
- Hyun T. K., Kim H. C., Ko Y. J., Kim J. S. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (*Empetrum nigrum* var. *japonicum*). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(2):181–188. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.02.008.
- Bezverkhniaia E. A., Povet'eva T. N., Kadyrova T. V., Suslov N. I., Nesterova Y. V., Afanas'eva O. G., Kul'pin P. V., Yusova Y. G., Ermilova E. V., Miroshnichenko A. G., Brazovskii K. S., Belousov M. V. Screening Study for Anticonvulsive Activity of Lipophilic Fractions from *Empetrum nigrum* L. *Research Results in Pharmacology*. 2020;6(3):67–73. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.55015.
- Kubitzki K. Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. V. 6. In: The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer. 2004;145–194. DOI: 10.1007/978-3-662-07257-8.
- Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A New Bibenzyl and 9,10-Dihydrophenanthrene Derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry Letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
- Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
- Jarevång T., Nilsson M. Ch., Wallstedt A., Oldham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
- Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica Acta*. 1992;105(4):300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00302.x.
- Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоксианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
- Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., de Mejia E. G., Raskin I., Lila M. A. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(7):3884–3900. DOI: 10.1021/jf902693r.
- Jurikova T., Mlcek J., Skrovankova S., Balla S., Sochor J., Baron M., Sumczynski D. Black crowberry (*Empetrum nigrum* L.) flavonoids and their health promoting activity. *Molecules*. 2016;21(12):1685. DOI: 10.3390/molecules21121685.
- Lindroth R. L. Atmospheric change, plant secondary metabolites and ecological interactions. In: *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: from Genes to Global Processes*. Cambridge: Cambridge University Press. 2012. P. 120–153. DOI: 10.1017/CBO9780511675751.008.
- Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M. R., Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020;148:80–89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
- Li Y., Wen K., Ruan X., Zhao Y., Wei F., Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 2018;23(4):762. DOI: 10.3390%2Fmolecules23040762.

20. Szakiel A., Paczkowski C., Henry M. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2011;10(4):471–491. DOI: 10.1007/s11101-010-9177-x.
21. Gleadow R. M., Woodrow I. E. Defense chemistry of cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* seedlings is affected by water supply. *Tree Physiology*. 2002;22:939–945. DOI: 10.1093/treephys/22.13.939.
22. Yifan Y. Impact of temperature regimes on flavonoid accumulation in Merlot (*Vitis vinifera* L.) grapes. *University of British Columbia*. 2019. DOI: 10.14288/1.0383334.
14. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
15. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnický D., Kuhn P., de Mejia E. G., Raskin I., Lila M. A. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(7):3884–3900. DOI: 10.1021/jf902693r.
16. Jurikova T., Mlcek J., Skrovankova S., Balla S., Sochor J., Baron M., Sumczynski D. Black crowberry (*Empetrum nigrum* L.) flavonoids and their health promoting activity. *Molecules*. 2016;21(12):1685. DOI: 10.3390/molecules21121685.
17. Lindroth R. L. Atmospheric change, plant secondary metabolites and ecological interactions. In: *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: from Genes to Global Processes*. Cambridge: Cambridge University Press. 2012. P. 120–153. DOI: 10.1017/CBO9780511675751.008.
18. Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M. R., Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020;148:80–89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
19. Li Y., Wen K., Ruan X., Zhao Y., Wei F., Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 2018;23(4):762. DOI: 10.3390/molecules23040762.
20. Szakiel A., Paczkowski C., Henry M. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2011;10(4):471–491. DOI: 10.1007/s11101-010-9177-x.
21. Gleadow R. M., Woodrow I. E. Defense chemistry of cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* seedlings is affected by water supply. *Tree Physiology*. 2002;22:939–945. DOI: 10.1093/treephys/22.13.939.
22. Yifan Y. Impact of temperature regimes on flavonoid accumulation in Merlot (*Vitis vinifera* L.) grapes. *University of British Columbia*. 2019. DOI: 10.14288/1.0383334.

REFERENCES

1. Solovieva N. L., Sokurenko M. S. Technologies to improve the stability of polyphenolic compounds in drug discovery. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;10(4):82–91. (In Russ.)
2. Sambukova T. V., Ovchinnikov B. V., Ganapolskii V. P., Yatmanov A. N., Shabanov P. D. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2017;15(2):56–63. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF15256-63.
3. Barnaulov O. D. Comparative estimation of cerebroprotective and other pharmacological properties plants family *Empetraceae*. *Traditsionnaya meditsina*. 2018;1(52):38–47. (In Russ.)
4. Huttunen S., Toivanen M., Arkko S., Ruponen M., Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytotherapy Research*. 2011;25(1):122–127. DOI: 10.1002/ptr.3240.
5. Kim K. C., Lee I. K., Kang K. A., Kim B. J., Kim D., Moon J. Y., Yoo B. S., Hyun J. W. *Empetrum nigrum* var. *japonicum* extract suppresses γ -ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(11):161–170. DOI: 10.1142/S0192415X11008725.
6. Nohynek L. J., Alakomi H. L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K. M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1):18–32. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_4.
7. Hyun T. K., Kim H. C., Ko Y. J., Kim J. S. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (*Empetrum nigrum* var. *japonicum*). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(2):181–188. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.02.008.
8. Bezverkhniaia E. A., Povet'eva T. N., Kadyrova T. V., Suslov N. I., Nesterova Y. V., Afanas'eva O. G., Kul'pin P. V., Yusova Y. G., Ermilova E. V., Miroshnichenko A. G., Brazovskii K. S., Belousov M. V. Screening Study for Anticonvulsive Activity of Lipophilic Fractions from *Empetrum nigrum* L. *Research Results in Pharmacology*. 2020;6(3):67–73. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.55015.
9. Kubitzki K. Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. V. 6. In: *The families and genera of vascular plants*. Berlin: Springer. 2004;145–194. DOI: 10.1007/978-3-662-07257-8.
10. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A New Bibenzyl and 9,10-Dihydrophenanthrene Derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry Letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
11. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
12. Jarevång T., Nilsson M. Ch., Wallstedt A., Oldham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
13. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica Acta*. 1992;105(4):300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00302.x.



Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия с пролонгированным высвобождением

Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур*, И. А. Наркевич, И. Е. Смехова, Д. Ю. Ивкин

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Ю. М. Коцур – [http://orcid.org/0000-0001-9292-4240](https://orcid.org/0000-0001-9292-4240); И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>; И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 07.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени является одним из наиболее часто встречающихся среди взрослого населения хронических заболеваний данного паренхиматозного органа. Поиск и создание поддерживающих препаратов – актуальная задача современной фармации. Синтезированное сотрудниками кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ производное малоновой кислоты, 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoат натрия, обладающее антистепатозной активностью, является потенциальным средством для терапии заболеваний печени. На основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия были получены таблетки с пролонгированным высвобождением. Неотъемлемой частью фармацевтической разработки лекарственного препарата является разработка методики проведения теста «Растворение» и подбор оптимальных условий, что и стало целью настоящего исследования.

Цель. Разработать методику проведения теста «Растворение» для лекарственной формы, таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия.

Материалы и методы. Объектами исследования являются активный фармацевтический ингредиент 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoат натрия, а также таблетки с пролонгированным высвобождением на основе данной субстанции. Равновесную биофармацевтическую растворимость определяли методом УФ-спектрофотометрии. Для установления условий проведения теста «Растворение» применяли тестер растворения ERWEKA DT-620 (ERWEKA GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение. Определена пригодность методики УФ-спектрофотометрии для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия в растворах. Установленная высокая биофармацевтическая растворимость 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия в буферном растворе с pH 6,8, а также в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты с pH 2,6, обусловила выбор указанных сред для проведения теста «Растворение» испытуемой лекарственной формы. Аппарат «Вращающаяся корзинка» (скорость вращения 10 об/мин в среде растворения объемом 1000 мл) был обоснован выбран для проведения теста на основании полученной линейной зависимости скорости высвобождения субстанции от времени, а также лучших результатов испытания к концу эксперимента.

Заключение. Проведено исследование биофармацевтических свойств оригинальной субстанции, обладающей антистепатозной активностью. Установлена ее высокая биофармацевтическая растворимость в средах с pH 2,6 и pH 6,8. Экспериментально обоснованы условия проведения теста «Растворение» для таблеток с пролонгированным высвобождением на основе оригинального 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия.

Ключевые слова: тест «Растворение», высвобождение, таблетки с пролонгированным высвобождением, производное малоновой кислоты, биофармацевтическая растворимость

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

Вклад авторов. Е. В. Флисюк и Ю. М. Коцур спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур проводила запланированные исследования. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю. Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия с пролонгированным высвобождением. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):146–154. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-146-154](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154)

Development of the "Dissolution" Test Method for Tablets of Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate with Sustained Release

Elena V. Flisyuk, Julia M. Kotsur*, Igor A. Narkevich, Irina E. Smekhova, Dmitry Yu. Ivkin

¹ Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Julia M. Kotsur. E-mail: uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Julia M. Kotsur – [http://orcid.org/0000-0001-9292-4240](https://orcid.org/0000-0001-9292-4240); Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>; Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>; Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Received: 20.10.2021

Revised: 07.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Non-alcoholic fatty liver disease is one of the most common chronic diseases of this parenchymal organ among the adult population. The search and creation of supporting drugs is an urgent task of modern pharmacy. The malonic acid derivative, sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene, synthesized by the employees of the Department of Organic Chemistry of the SPCPU, has antisteatous activity, is a potential agent for the treatment of liver diseases. Sustained release tablets were prepared based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene. An integral part of the pharmaceutical development of a medicinal product is the development of a method for conducting the Dissolution test and the selection of optimal conditions, which became the purpose of this study.

Aim. To develop the "Dissolution" test method for the sustained-release tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene.

Materials and methods. The objects of research are the active pharmaceutical ingredient sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene, as well as sustained-release tablets based on this substance. Equilibrium biopharmaceutical solubility was determined by UV-spectrophotometry. To establish the conditions for the "Dissolution" test, an ERWEKA DT-620 dissolution tester (ERWEKA GmbH, Germany) was used.

Results and discussion. The suitability of the UV-spectrophotometry method for the quantitative determination of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene in solutions was determined. The established high biopharmaceutical solubility of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene in a buffer solution with a pH of 6.8, as well as in a 0.01 M solution of hydrochloric acid with a pH of 2.6, determined the choice of these media for the "Dissolution" test of the dosage form. The apparatus "Rotating basket" (rotation speed of 100 rpm in a dissolution medium with a volume of 1000 ml) was reasonably chosen for the test on the basis of the obtained linear dependence of the rate of release of the substance on time, as well as the best test results by the end of the experiment.

Conclusion. A study of the biopharmaceutical properties of the original substance with antisteatous activity has been carried out. High biopharmaceutical solubility was established in media with pH 2.6 and pH 6.8. The conditions of the "Dissolution" test for sustained-release tablets based on the original sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene were experimentally substantiated.

Keywords: dissolution test, release, sustained-release tablets, malonic acid derivative, biopharmaceutical solubility

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 V. Flisyuk and Julia M. Kotsur developed an experiment. Julia M. Kotsur conducted the planned studies. All authors participated in data processing, text writing and discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Flisyuk E. V., Kotsur Ju. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu. Development of the "Dissolution" test method for tablets of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzene with sustained release. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):146–154. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-146-154](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154)

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) одним из самых распространенных хронических заболеваний печени среди взрослого населения на сегодняшний день является неалкогольная жировая болезнь печени [1]. Данная патология ассоциируется с кардиометаболическими факторами риска и сопряжено с другими заболеваниями, такими как ожирение, сахарный диабет второго типа, стеатогепатит [2, 3]. В связи с тем, что терапия при данном заболевании зачастую ограничивается лишь занятиями физической культурой и приемом лекарственных средств (ЛС), поддерживающих физическую работоспособность пациента [3] актуальным является разработка лекарственного препарата (ЛП) антisteатозного действия. В качестве таких средств интерес представляют производные малоновой кислоты. Малоновая кислота (МК) принимает участие в обменных процессах живого организма, являясь предшественником в каскадах биосинтеза жирных кислот [2].

Сотрудниками кафедры органической химии нашего Университета под руководством профессора И. П. Яковлева было синтезировано производное МК (4,4'-(пропандиамидо)дibenzoat натрия) с выраженным

антisteатозным действием [4]. Его разовая доза составляет 60 мг, суточная – 180 мг. Субстанция представляет собой кристаллический порошок белого цвета, без запаха, легкорастворимый в воде. На основе данной активной фармацевтической субстанции (АФС) были получены матричные таблетки с пролонгированным высвобождением, что обеспечивало уменьшение проявления концентрационно зависимых побочных эффектов, увеличение комплаентности пациентов и т. д.

В настоящее время основными средствами разработки и изучения твердых пероральных лекарственных форм (ЛФ) являются тест «Растворение» и тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР), что обусловлено зависимостью биодоступности активной фармацевтической субстанции от растворения ЛП [5]. Задачей теста «Растворение» является оценка качества ЛП в заданной ЛФ путем определения количества действующего вещества, которое в описанных нормативным документом условиях, за определенный промежуток времени должно высвобождаться в среду растворения из данной ЛФ [6]. Описанный выше тест используют с целью подтверждения постоянства свойств ЛФ и условий надлежащего производственного процесса. Тест «Растворение» является обяза-

тельной частью испытаний *in vitro* при изучении механизма высвобождения действующего вещества из предлагаемой ЛФ [7]. ТСКР позволяет сравнить эквивалентность профилей растворения исследуемого и референтного препаратов в близких к физиологическим условиям ЖКТ условиях. Проведение теста направлено на оценку правильности технологических решений, увеличение вероятности положительных результатов дальнейших исследований биоэквивалентности, что обуславливает его применение на этапе фармацевтической разработки ЛП [8, 9].

Для корректной разработки теста «Растворение» необходимо установить биофармацевтические свойства ДВ в соответствии с предложенной Amidon с соавт. в 1995 г биофармацевтической классификационной системой (БКС), используемой в настоящее время для прогнозирования биодоступности субстанции, обосновании состава, дизайна и технологии ЛП [10–12].

Целью настоящего исследования явилась разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия с пролонгированным высвобождением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись: оригинальная АФС 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoат натрия и готовая ЛФ на ее основе – таблетки с пролонгированным высвобождением. Соединение является солью слабой двухосновной кислоты, которая в водных растворах проявляет основные свойства. Отрицательный логарифм константы кислотной диссоциации АФС, определенный путем потенциометрического титрования, составляет $6,2 \pm 0,2$ [13].

Таблетки на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия содержали суточную дозу вещества. В качестве вспомогательных веществ в составе таблеток использовали гипромеллозу Methocel K4M (Dow, Германия), лактозу SuperTab 30GR (DFE Pharma, Германия) и магния стеарат фармакопейный (Lekko, Россия).

4,4'-(пропандиамидо)дibenzoат натрия представляет собой белый легкорастворимый в воде кристаллический порошок без запаха.

Измерительное оборудование: УФ-спектрофотометр СФ2000 (ОКБ Спектр, Россия); весы лабораторные электронные СЕ-224-С (Sartorius AG, Германия).

Вспомогательное оборудование:

- ✓ Прибор для теста «Растворение» DT620 (ERWEKA GmbH, Германия).
- ✓ Шприцевые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, материал PTFE, AF0-1102-52 (Phenex, Phenomenex).
- ✓ pH-метр PB-11 (Sartorius AG, Германия).
- ✓ Ультразвуковая ванна УЗВ-2,8 (ООО «Сапфир», Россия).
- ✓ Центрифуга MPW-351(MPW Med.Instruments, Польша).
- ✓ Термошайкер TS-100 (BioSan, Латвия).
- ✓ Сушильный шкаф с принудительной конвекцией OF-12G (JeioTech, Южная Корея).

Реактивы и материалы:

- ✓ Вода очищенная.
- ✓ Кислота хлористоводородная, ос.ч., срок годности до 07.2020 (АО «ВЕКТОН», Россия).
- ✓ Кислота лимонная, ИМП, срок годности до 07.2021 (АО «ВЕКТОН», Россия).
- ✓ Динатрия гидрофосфат. С. A0391772, Cat № 44814, срок годности до 12.2020 (Acros Organics, США).
- ✓ Кислота уксусная ледяная, х.ч., срок годности до 07.2020 (АО «ВЕКТОН», Россия).
- ✓ Аммоний уксуснокислый, чистый для анализа, срок годности до 11.2021 (АО «ЭКОС-1», Россия).

Приготовление 1 М раствора хлористоводородной кислоты: 87,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной доводят водой до объема 1000,0 мл (1 М раствор).

Приготовление 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты pH 2,6: 10,0 мл полученного 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объема 1000,0 мл. При необходимости доводят pH до 2,6.

Приготовление 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты: 100,0 мл полученного 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объема 1000,0 мл. При необходимости доводят pH до 1,2.

Приготовление ацетатного буферного раствора pH 4,5: 63,0 г натрия ацетата безводного растворяют в воде, прибавляют 90,0 мл уксусной кислоты разведенной 30 %. Доводят pH до 4,5 потенциометрически уксусной кислотой разведенной 30 % и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Приготовление фосфатного буферного раствора pH 6,8: 77,3 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивают с 22,7 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Приготовление раствора плацебо: в сосуд для растворения с фосфатным буферным раствором с pH 6,8 помещали одну таблетку плацебо массой 180 мг, аналогичную по составу таблетке, содержащей АФС. Через 12 часов отбирали пробу раствора объемом 10,0 мл и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. 1,0 мл раствора плацебо помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора соответствующим раствором среды растворения до метки и перемешивали.

Приготовления стандартного раствора 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия: точную навеску АФС с содержанием основного вещества 99,7 % (около 25 мг) помещали в мерную колбу объемом 50 мл, приливали около 30 мл воды очищенной. Колбу размещали в ультразвуковой ванне на 5 мин с полным растворением АФС при температуре 30 °C. После охлаждения раствора до комнатной температуры доводили объем до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали (концентрация раствора составила 0,5 мг/мл). 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу 2 класса точности объемом 50 мл, приливали 30 мл воды очищенной с последующим перемешиванием и доведением объема растворения до метки.

вора до метки тем же растворителем (концентрация раствора составила 0,01 мг/мл).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета Microsoft Office Excel 2010.

На момент проведения исследований все реактивы имели не истекший срок годности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработку методики проведения теста «Растворение» проводили в несколько этапов. На первом определяли пригодность методики УФ-спектрофотометрии для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия. На втором этапе устанавливали равновесную биофармацевтическую растворимость 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия для обоснования выбора сред растворения. На третьем – определяли объем среды растворения и обосновывали выбор аппарата.

Выбор условий для проведения теста «Растворение» был осуществлен на основании биофармацевтических характеристик, а также на основании анализа литературных источников и данных Государственной Фармакопеи РФ (ГФ РФ) XIV издания и Фармакопеи Евразийского экономического союза [7, 14–20].

Разработанные таблетки с пролонгированным высвобождением относятся к третьей группе препаратов согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» и ОФС.2.9.3. «Испытание «Растворение» для твердых дозированных лекарственных форм». В соответствии с требованием данных статей, тест «Растворение» для пролонгированных таблеток проводится в условиях,

аналогичных условиям теста для ЛФ с обычным высвобождением, однако должно быть указано не менее трех временных интервалов отбора проб [14, 15].

При этом во многих исследованиях тест «Растворение» для пролонгированных ЛФ проводят в две и более стадии с целью имитации прохождения ЛФ через желудок и, при необходимости, прохождения через отделы кишечника [18, 20].

Таким образом, при разработке методики проведения теста «Растворение» для пролонгированных ЛФ, руководствуются биофармацевтическими свойствами АФС, желаемой кинетикой высвобождения, необходимостью определения количества высвободившегося АФС до достижения места действия.

Определение пригодности методики УФ-спектрофотометрии для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия.

УФ-спектрофотометрия является методикой количественного определения, рекомендованной ГФ РФ XIV изд. наряду с хроматографическими методами анализа.

Для определения пригодности данной методики для количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия проводили изучение таких характеристик, как специфичность, правильность, линейность и аналитическая область.

Для определения специфичность снимали спектры растворов сред растворения с различными pH (1,2; 2,6; 4,5; 6,8), раствора плацебо, а также спектр раствора стандартного образца 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия (рисунки 1, 2). Для каждого раствора проводили не менее трех измерений.

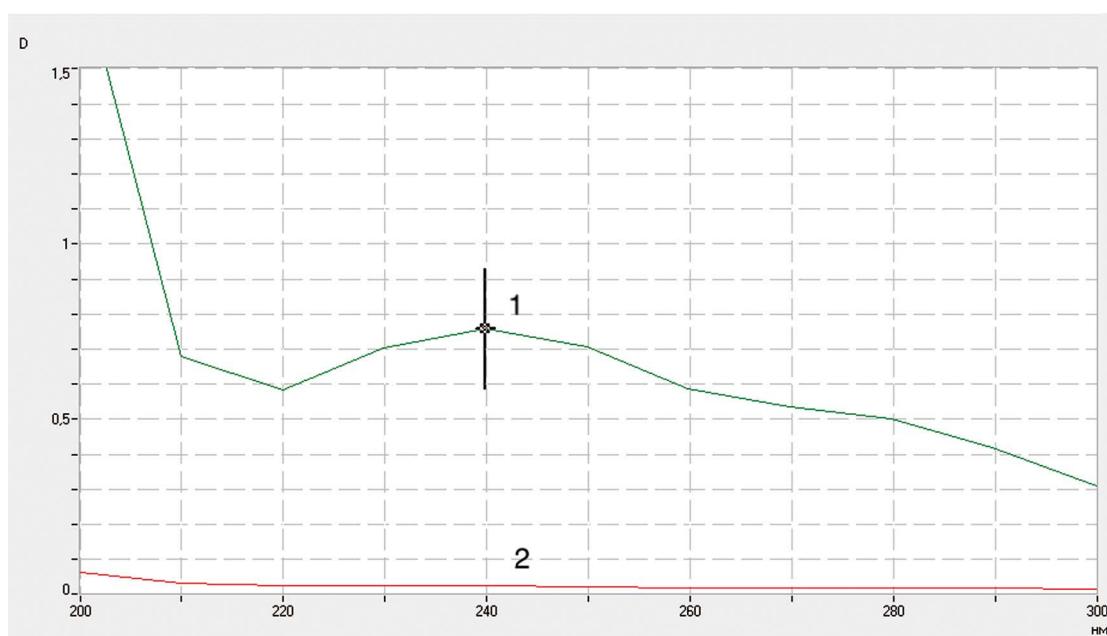


Рисунок 1. Зависимость оптической плотности (D) растворов от длины волн (нм):

1 – раствора стандартного образца 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия; 2 – раствора плацебо

Figure 1. The dependence of the optical density (D) of solutions on the wavelength (nm):

1 – a solution of a standard sample 4,4' - sodium (propanediamido)dibenzoate; 2 – placebo solution

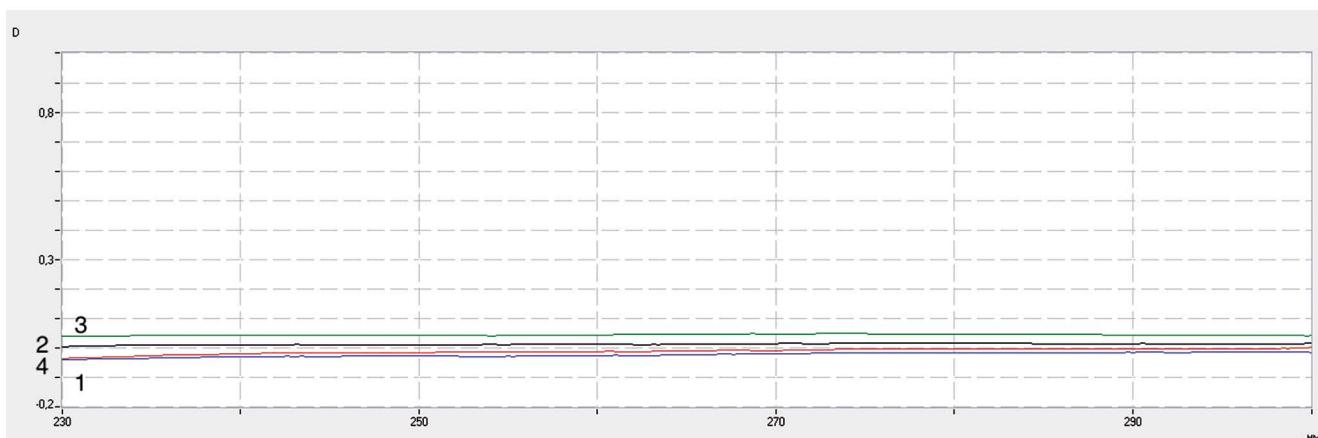


Рисунок 2. Зависимость оптической плотности (D) растворов от длины волны (нм):

1 – 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 1,2; 2 – 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 2,6; 3 – ацетатного буферного раствора с pH 4,5; 4 – фосфатного буферного раствора с pH 6,8

Figure 2. The dependence of the optical density (D) of solutions on the wavelength (nm):

1 – 0,1 M hydrochloric acid solution with pH 1,2; 2 – 0,01 M hydrochloric acid solution with pH 2,6; 3 – acetate buffer solution with pH 4,5; 4 – phosphate buffer solution with a pH of 6,8

Линейность определяли путем измерения оптической плотности серии модельных растворов с содержанием 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия в диапазоне концентраций от 0,002 до 0,012 мг/мл (рисунок 3).

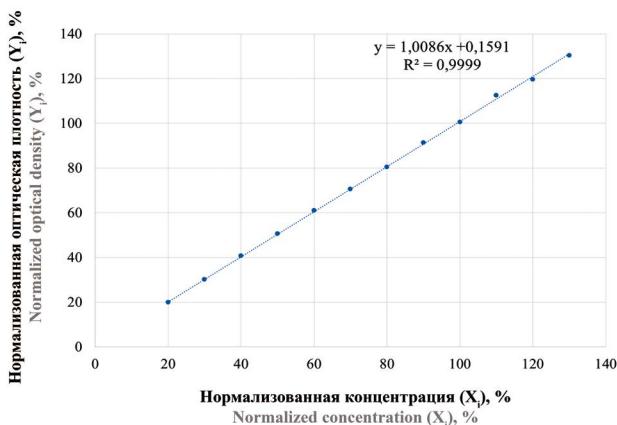


Рисунок 3. График зависимости оптической плотности от концентрации 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия в растворах в нормализованных координатах

Figure 3. Graph of the dependence of optical density on the concentration of 4,4'-sodium(propanediamido)dibenzzoate in the solutions in normalized coordinates

Установлено, что данный метод является специфичным и линейным, следовательно, позволяет определить концентрацию АФС в растворах.

Определение биофармацевтической растворимости.

Анализ параметров проведения теста «Растворения» приведенных в базе данных FDA показал, что для определения высвобождения азотсодержа-

щих ароматических соединений из таблеток применяют 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной с различными значениями pH [21]. Проведенный ранее эксперимент по определению отрицательного логарифма константы кислотной диссоциации путем потенциометрического титрования показал, что при титровании АФС 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты наблюдается выраженный скачок в диапазоне pH 3,5–5,5, в связи с этим интерес представляло определение биофармацевтической растворимости в диапазоне pH от 1,2 до 3,5, исходя из этого в качестве сред растворения были выбраны 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2 и 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 2,6.

В качестве сред, пригодных для имитации условий кишечника были выбраны ацетатный буферный раствор с pH 4,5, а также фосфатный буферный раствор с pH 6,8. Данные среды наиболее часто применяются для изучения растворения пролонгированных ЛФ, кроме того, рекомендованы при проведении ТСКР для воспроизведенных препаратов [6].

Определение биофармацевтической растворимости 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия проводили по установлению равновесной растворимости в средах с различными значениями pH (1,2; 2,6; 4,5; 6,8) по методикам, аналогичным описанным ранее в литературе [22].

Термошайкер использовали в приготовлении испытуемых растворов. В микропробирки фактического объема 2 мл с 1 мл среды растворения внутри помещали по 0,1 г АФИ. Микропробирки помещались в термошайкер с регулируемым терmostатированием при 37 °C и скоростью взвешивания, равной 1400 об/мин [22].

Растворение проводили в течение суток. Испытание проводили в трех повторностях для каждой среды растворения (буферные растворы с pH 1,2; 2,6; 4,5; 6,8). Через 24 часа центрифугировали пробы. Отбирали по 100 мкл надосадочной жидкости и помещали в пробирки объемом 10 мл, добавляли 9,9 мл соответствующей среды растворения, проводили тщательное перемешивание. Аликвоту полученного раствора объемом 1 мл переносили в пробирки вместимостью 10 мл и добавляли 9 мл соответствующей среды растворения (испытуемые растворы).

Методом УФ-спектрофотометрии при максимуме поглощения субстанции 238 ± 2 нм в кювете кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм проводили в полученных растворах количественное определение АФС. В качестве раствора сравнения использовалась соответствующая среда растворения. Примеры УФ-спектров полученных растворов представлены на рисунке 4.

Значения биофармацевтической растворимости АФС рассчитывались по формуле (1) [22]:

$$S = \frac{D_i \cdot C_{st} \cdot V \cdot P}{D_{st} \cdot 100}, \quad (1)$$

где S – биофармацевтическая растворимость, мг/мл; D_i – оптическая плотность испытуемого раствора; D_{st} – оптическая плотность стандартного раствора; V – разведение испытуемого раствора; P – содержание основного вещества в АФИ, взятом для приготовления стандартного раствора, %; C_{st} – концентрация стандартного раствора, мг/мл.

Для каждого значения растворимости во всех буферных растворах определяли отношение дозы к растворимости по формуле (2):

$$\frac{D}{S} = \frac{D_{max}}{S}, \quad (2)$$

где $\frac{D}{S}$ – отношение дозы к растворимости, мл; D_{max} – максимальная дозировка ЛС, мг.

Так как исследуемый препарат ранее не был зарегистрирован на территории РФ, за максимальную принимали дозировку субстанции в таблетках с немедленным высвобождением, которая составляла 60 мг. Результаты представлены в таблице 1.

При отношении дозы к растворимости менее 250 мл растворимость субстанции считали «высокой» [22]. Таким образом, в средах с pH 1,2; 2,6 и 6,8 наблюдается «высокая» биофармацевтическая растворимость исследуемой субстанции. При этом, в среде с pH 6,8 наблюдается наиболее высокая биофармацевтическая растворимость, вследствие этого данная среда была выбрана для проведения теста «Растворение».

В физиологических условиях таблетки с пролонгированным высвобождением до достижения места действия проходят через желудок. Для определения степени высвобождения в среде желудка необходимо было выбрать соответствующую среду растворения.

Среди исследованных сред с pH 1,2 и 2,6 наибольшей биофармацевтической растворимостью АФС обладает в среде 0,01 М хлористоводородной кислоты с pH 2,6.

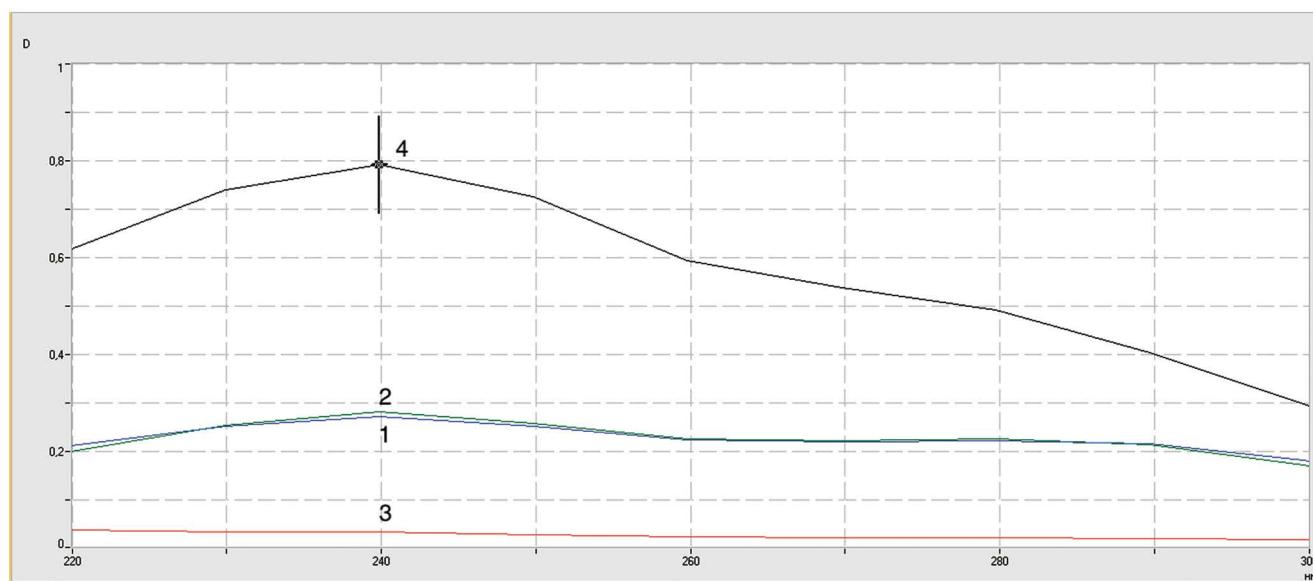


Рисунок 4. Зависимость оптической плотности (D) растворов 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия от длины волн (нм):
1 – в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты pH 1,2; 2 – в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты pH 2,6; 3 – в ацетатном буферном растворе pH 4,5; 4 – в фосфатном буферном растворе pH 6,8

Figure 4. The dependence of the optical density (D) of sodium 4,4'-(propandiamido)dibenzoate solutions on the wavelength (nm):

1 – in 0,1 M hydrochloric acid solution pH 1,2; 2 – in 0,01 M hydrochloric acid solution pH 2,6; 3 – in acetate buffer solution pH 4,5; 4 – in phosphate buffer solution pH 6,8

Таблица 1. Результаты определения биофармацевтической растворимости 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия

Table 1. The results of the determination of biopharmaceutical dissolution sodium 4,4'-(propandiamido)dibenzoate

Среда растворения Dissolution media	Оптическая плотность испытуемого раствора Optical density of the test solution	Количество растворившегося АФИ, мг/мл The amount of dissolved API, mg/ml	Среднее значение, мг/мл (n = 3, P = 95 %) Average value, mg / ml (n = 3, P = 95 %)	D/S, мл D/S, ml
Буферный раствор с pH 1,2 Buffer solution pH 1,2	0,2695	0,241	0,241 ± 0,006 RSD = 0,0027	244,8
	0,2731	0,244		241,6
	0,2678	0,239		246,4
Буферный раствор с pH 2,6 Buffer solution pH 2,6	0,2790	0,249	0,250 ± 0,003 RSD = 0,0012	236,5
	0,2815	0,251		234,4
	0,2802	0,250		235,5
Буферный раствор с pH 4,5 Buffer solution pH 4,5	0,0083	0,007	0,0087 ± 0,0028 RSD = 0,0013	7949,6
	0,0106	0,009		6224,7
	0,0104	0,009		6344,4
Буферный раствор с pH 6,8 Buffer solution pH 6,8	0,7909	0,706	0,706 ± 0,009 RSD = 0,0042	83,4
	0,7860	0,702		83,9
	0,7942	0,709		83,1

Для значений биофармацевтической растворимости в средах с pH 1,2 и с pH 2,6 была проведена проверка достоверности отличий при помощи пакета Microsoft Office Excel 2010 путем определения t-критерия Стьюдента для двух независимых выборок. При уровне значимости $\alpha = 0,05$ значение t-критерия составило 4,68, критическое значение t-критерия Стьюдента – 2,776. Таким образом, между значениями биофармацевтической растворимости в средах с pH 1,2 и с pH 2,6 существуют достоверные отличия.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что для проведения теста «Растворение» для таблеток с модифицированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия будет рационально использовать следующие среды растворения: в первые два часа – 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 2,6 – для имитации прохождения ЛП через желудок, со 2 по 12 час – буферный раствор с pH 6,8.

Определение объема среды растворения и типа аппарата.

Согласно рекомендациям ГФ РФ XIV изд. (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм») объем среды не должен быть менее 500 мл. При этом, Фармакопей Евразийского экономического союза не предъявляются требования к объему среды при проведении теста «Растворение» для ЛФ первой и третьей групп [14, 15].

В связи с этим, для растворения исследуемых таблеток были выбраны объемы 500 мл и 1000 мл.

В качестве аппаратов использовали «Вращающуюся корзинку» и «Лопастную мешалку» с рекомендуемыми скоростями вращения, равными 100 об/мин и 50 об/мин, соответственно [14,15]. Испытание проводили при температуре среды растворения (37 ± 0,5) °C в течение 12 часов: в первые два часа – в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной, последующие 10 часов – в буферном растворе с pH 6,8. Среды растворения дезаэрировали в соответствии с методикой, изложенной в ОФС.1.4.2.0014.15 [14].

Изучали высвобождение субстанции из модельных таблеток с модифицированным высвобождением, с дозировкой 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия равной 180 мг. В состав таблеток входили гипромеллоза Methocel K4M (Dow, Германия), лактоза SuperTab 30GR (DFE Pharma, Германия) и магния стеарат фармакопейный (Lekko, Россия).

В каждый из сосудов тестера помещали по одной испытуемой таблетке (в центральную часть дна сосуда – при использовании аппарата «Лопастная мешалка» или внутрь корзинки аппарата «Вращающаяся корзинка»). По истечении 2 часов проводили полную замену среды растворения.

Пробы по 10,0 мл отбирали через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 часов от начала эксперимента, объем среды растворения восполняли. Из каждой отобранный пробы брали аликовту 1,0 мл в мерную колбу вместимостью 100 мл 2 класса точности и доводили раствор до метки соответствующей средой растворения (испытуемый раствор).

Количество вещества, перешедшего в среду растворения, определяли методом УФ-спектрофотометрии при максимуме поглощения 238 ± 2 нм в кювете кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующую среду растворения. Количество высвободившегося вещества (X, %) рассчитывали по формуле 3:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot V \cdot N \cdot 100}{A_0 \cdot L}, \quad (3)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность стандартного раствора; a_0 – навеска вещества в стандартном растворе, г; N – коэффициент, учитывающий разведение; V – объем среды растворения, мл; P – содержание основного вещества в АФИ, использованном для приготовления

стандартного раствора, %; L – заявленное содержание вещества в таблетке, г.

Результаты испытания в средах разного объема представлены на рисунках 5 и 6.

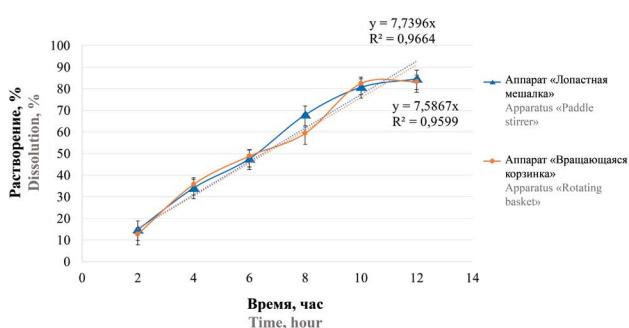


Рисунок 5. Профили растворения 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия из таблеток с пролонгированным высвобождением в среде объемом 500 мл

Figure 5. Dissolution profiles of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from prolonged release tablets in medium volume of 500 ml

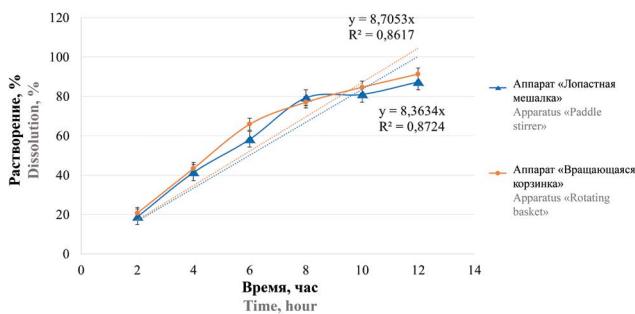


Рисунок 6. Профили растворения 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия из таблеток с пролонгированным высвобождением в среде объемом 1000 мл

Figure 6. Dissolution profiles of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from prolonged release tablets in medium volume of 1000 ml

При разработке пролонгированных ЛФ наиболее предпочтительной кинетикой высвобождения является кинетика нулевого порядка. Такая скорость позволяет поддерживать постоянную концентрацию АФС в плазме, и, как следствие, оптимизировать терапевтическое действие и минимизировать побочные эффекты [23–25].

Линейная зависимость скорости высвобождения субстанции от времени для обоих аппаратов наиболее выражена в среде объемом 500 мл. Однако в среде объемом 1000 мл наблюдается более полное высвобождение 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия. Так, при проведении испытания в аппарате «Вращающаяся корзинка» через 12 часов из таблеток высвобождается более 90 % вещества, тогда как в аппарате «Лопастная мешалка» – около 87 %.

Таким образом, наилучшие показатели высвобождения при проведении теста были достигнуты с применением «вращающейся корзинки» со скоростью вращения, равной 100 об/мин и среды растворения объемом 1000 мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование биофармацевтических свойств оригинальной субстанции, обладающей антистазозной активностью. Установлена ее высокая биофармацевтическая растворимость в средах с pH 2,6 и pH 6,8. Экспериментально обоснованы условия проведения теста «Растворение» для таблеток с пролонгированным высвобождением на основе оригинального 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия.

ЛИТЕРАТУРА

- Глобальный доклад по диабету [Global report on diabetes]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2018. 88 с.
- O'Neill S., O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*. 2015;16(1):1–12. DOI: 10.1111/obr.12229.
- Сояян Ч., Киргизова О. Ю. Метаболический синдром: некоторые итоги и перспективы решения проблемы. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2016;1(5):187–194.
- Радько С. В. Оценка влияния 4,4'-(пропандиамидо)дibenzoата натрия на физическую работоспособность мышей к экспериментальным стеатозом печени. Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». 2017 8–9 ноября. Санкт-Петербург: СПХФУ; 2017. С. 29–32.
- Гребенкин Д. Ю., Станишевский Я. М., Шохин И. Е., Малашенко Е. А. Ретроспектива развития науки о растворении твердых дозированных лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;4(17):158–166.
- Гребенкин Д. Ю., Станишевский Я. М., Шохин И. Е. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;1(14):166–171.
- Мустафин Р. И., Ситенкова (Буховец) А. В., Фотаки Н. Особенности проведения предиктивного теста «Растворение». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;1(18):156–162.
- Смехова И. Е., Перова Ю. М. Кондратьева И. А., Родыгина А. Н., Турецкова Н. Н. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013;1(2):50–61.
- Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
- Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Research*. 1995;12:413–420.
- Michele G. I., Humberto G. F. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*. 2011;3:6–15. DOI: 10.14227/DT180311P6.
- Dressman J. B., Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:591–602. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.009.
- Алексеева Г. М., Апраксин В. Ф., Генералова Ю. Э. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):66–71. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopeia.php>. Ссылка активна на 28.10.2021.

15. Фармакопея Евразийского экономического союза. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Ссылка активна на 28.10.2021.
16. Garbacz G., Klein S. Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;(64):944–968. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01477.x.
17. Walker R., Mwila C. Development and assessment of a USP Apparatus 3 dissolution test method for sustained-release nevirapine matrix tablets. *Dissolution Technologies*. 2016;22–30. DOI: 10.14227/DT230316P22.
18. Li J., Yang L., Ferguson S. M., Hudson T. J., Watanabe S., Katsuma M., Fix J. A. In vitro evaluation of dissolution behavior for a colon-specific drug delivery system (CODES™) in multi-pH media using United States Pharmacopoeia Apparatus II and III. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(4):1–9. DOI: 10.1208/pt030433.
19. Kumawat S., Sharma D. M., Rathore S. D., Agarwal M. Review on sustaines release technology. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive*. 2019;7(6):29–38.
20. Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135–46.
21. FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 28.10.2021.
22. Шамаль Л. Л., Ярушок Т. А., Шохин И. Е., Раменская Г. В. Изучение равновесной биофармацевтической растворимости субстанций ЛС, применяемых при лечении онкологических заболеваний. *Ремедиум*. 2014;(11):73–76.
23. Cerea M., Maroni A., Palugan L., Moutaharrik S., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Gazzaniga A. Oral hydrophilic matrices having non-uniform drug distribution for zero-order release: a literature review. *Journal of Controlled Release*. 2020;325:72–83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.033.
24. Maroni A., Zema L., Cerea M., Foppoli A., Palugan L., Gazzaniga A. Erodible drug delivery systems for time-controlled release into the gastrointestinal tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;1–7. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.10.001.
25. Zhao Y.-N., Xu X., Wen N., Song R., Meng Q., Guan Y., Cheng S., Cao D., Dong Y., Qie J., Liu K., Zhang Y. A drug carrier for sustained zero-order release of peptide therapeutics. *Scientific Reports*. 2017;7:5524. DOI: 10.1038/s41598-017-05898-6.
7. Mustafin R. I., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Fotaki N. Features of the predictive test "Dissolution". *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;1(18):156–162. (In Russ.)
8. Smekhova I. E., Perova Yu. M., Kondratyeva I. A., Rodygina A. N., Turetskova N. N. Dissolution test and modern approaches to assessing the equivalence of drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2013;1(2):50–61. (In Russ.)
9. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of design and technology of a dosage form. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2):56–60. (In Russ.)
10. Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Research*. 1995;12:413–420.
11. Michele G. I., Humberto G. F. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*. 2011;3:6–15. DOI: 10.14227/DT180311P6.
12. Dressman J. B., Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:591–602. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.009.
13. Alekseeva G. M., Apraksin V. F., Generalova Yu. E. Study of acid-base properties, development and validation of a method for quantitative determination of an original pharmaceutical substance. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(1):66–71. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.
14. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
15. Farmakopeja Evraziskogo jekonomiceskogo sojuzu [Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Accessed: 28.10.2021.
16. Garbacz G., Klein S. Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;(64):944–968. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01477.x.
17. Walker R., Mwila C. Development and assessment of a USP Apparatus 3 dissolution test method for sustained-release nevirapine matrix tablets. *Dissolution Technologies*. 2016;22–30. DOI: 10.14227/DT230316P22.
18. Li J., Yang L., Ferguson S. M., Hudson T. J., Watanabe S., Katsuma M., Fix J. A. In vitro evaluation of dissolution behavior for a colon-specific drug delivery system (CODES™) in multi-pH media using United States Pharmacopoeia Apparatus II and III. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(4):1–9. DOI: 10.1208/pt030433.
19. Kumawat S., Sharma D. M., Rathore S. D., Agarwal M. Review on sustaines release technology. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive*. 2019;7(6):29–38.
20. Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135–46.
21. FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 28.10.2021.
22. Shamal L. L., Yarushok T. A., Shokhin I. E., Ramenskaya G. V. Study of the equilibrium biopharmaceutical solubility of drug substances used in the treatment of oncological diseases. *Remedium*. 2014;(11):73–76. (In Russ.)
23. Cerea M., Maroni A., Palugan L., Moutaharrik S., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Gazzaniga A. Oral hydrophilic matrices having non-uniform drug distribution for zero-order release: a literature review. *Journal of Controlled Release*. 2020;325:72–83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.033.
24. Maroni A., Zema L., Cerea M., Foppoli A., Palugan L., Gazzaniga A. Erodible drug delivery systems for time-controlled release into the gastrointestinal tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;1–7. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.10.001.
25. Zhao Y.-N., Xu X., Wen N., Song R., Meng Q., Guan Y., Cheng S., Cao D., Dong Y., Qie J., Liu K., Zhang Y. A drug carrier for sustained zero-order release of peptide therapeutics. *Scientific Reports*. 2017;7:5524. DOI: 10.1038/s41598-017-05898-6.

REFERENCES

1. *Global'nyj doklad po diabetu* [Global report on diabetes]. Geneva: World Health Organization. 2018. 88 p. (In Russ.)
2. O'Neill S., O'Driscoll L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*. 2015;16(1):1–12. DOI: 10.1111/obr.12229.
3. Xiaoyan Ch., Kirgizova O. Yu. Metabolic syndrome: some results and prospects for solving the problem. *Bulletin VSNTS SB RAMS*. 2016;1(5):187–194. (In Russ.).
4. Radko S. V. *Ocenka vlijanija 4,4'-(propandiamido)dibenzoata natrija na fizicheskuju rabotosposobnost' myshej k jekperimental'nym steatozom pecheni* Sbornik materialov V Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdrarov'e nacii» [Evaluation of the effect of 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate on the physical performance of mice with experimental liver steatosis. Collection of materials of the V All-Russian scientific-practical conference with international participation "Innovations in the health of the nation"]. *Sbornik materialov V Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdrarov'e nacii»*; 2017 Nov 8–9; St. Petersburg: SPKhFU; 2017. P. 29–32 (In Russ.)
5. Grebenkin D. Yu., Stanishevsky Ya. M., Shokhin I. E., Malashenko E. A. A retrospective of the development of the science of dissolution of solid dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;4(17):158–166. (In Russ.)
6. Grebenkin D. Yu., Stanishevsky Ya. M., Shokhin I. E. Modern approaches to the comparative dissolution kinetics test. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development and registration*. 2016;1(14):166–171. (In Russ.)
7. Mustafin R. I., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Fotaki N. Features of the predictive test "Dissolution". *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;1(18):156–162. (In Russ.)
8. Smekhova I. E., Perova Yu. M., Kondratyeva I. A., Rodygina A. N., Turetskova N. N. Dissolution test and modern approaches to assessing the equivalence of drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2013;1(2):50–61. (In Russ.)
9. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of design and technology of a dosage form. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2):56–60. (In Russ.)
10. Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Research*. 1995;12:413–420.
11. Michele G. I., Humberto G. F. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*. 2011;3:6–15. DOI: 10.14227/DT180311P6.
12. Dressman J. B., Vertzoni M., Goumas K., Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:591–602. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.009.
13. Alekseeva G. M., Apraksin V. F., Generalova Yu. E. Study of acid-base properties, development and validation of a method for quantitative determination of an original pharmaceutical substance. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(1):66–71. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71.
14. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
15. Farmakopeja Evraziskogo jekonomiceskogo sojuzu [Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Accessed: 28.10.2021.
16. Garbacz G., Klein S. Dissolution testing of oral modified-release dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;(64):944–968. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01477.x.
17. Walker R., Mwila C. Development and assessment of a USP Apparatus 3 dissolution test method for sustained-release nevirapine matrix tablets. *Dissolution Technologies*. 2016;22–30. DOI: 10.14227/DT230316P22.
18. Li J., Yang L., Ferguson S. M., Hudson T. J., Watanabe S., Katsuma M., Fix J. A. In vitro evaluation of dissolution behavior for a colon-specific drug delivery system (CODES™) in multi-pH media using United States Pharmacopoeia Apparatus II and III. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(4):1–9. DOI: 10.1208/pt030433.
19. Kumawat S., Sharma D. M., Rathore S. D., Agarwal M. Review on sustaines release technology. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive*. 2019;7(6):29–38.
20. Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135–46.
21. FDA dissolution methods database. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 28.10.2021.
22. Shamal L. L., Yarushok T. A., Shokhin I. E., Ramenskaya G. V. Study of the equilibrium biopharmaceutical solubility of drug substances used in the treatment of oncological diseases. *Remedium*. 2014;(11):73–76. (In Russ.)
23. Cerea M., Maroni A., Palugan L., Moutaharrik S., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Gazzaniga A. Oral hydrophilic matrices having non-uniform drug distribution for zero-order release: a literature review. *Journal of Controlled Release*. 2020;325:72–83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.033.
24. Maroni A., Zema L., Cerea M., Foppoli A., Palugan L., Gazzaniga A. Erodible drug delivery systems for time-controlled release into the gastrointestinal tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;1–7. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.10.001.
25. Zhao Y.-N., Xu X., Wen N., Song R., Meng Q., Guan Y., Cheng S., Cao D., Dong Y., Qie J., Liu K., Zhang Y. A drug carrier for sustained zero-order release of peptide therapeutics. *Scientific Reports*. 2017;7:5524. DOI: 10.1038/s41598-017-05898-6.



Модификация модели неалкогольной жировой болезни печени у крыс при сочетании гиперкалорийной диеты и гиподинамии

А. В. Бунят^{1*}, О. М. Спасенкова², В. Е. Карев³, А. В. Караваева², Д. Ю. Ивкин², А. Н. Куликов¹, С. В. Оковитый², Н. В. Кириллова²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова», 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

*Контактное лицо: Бунят Анна Валерьевна. E-mail: tkaannavaler12@gmail.com

ORCID: А. В. Бунят – <https://orcid.org/0000-0002-4048-4754>; О. М. Спасенкова – <https://orcid.org/0000-0002-2924-7651>; В. Е. Карев – <https://orcid.org/0000-0002-7972-1286>;

А. В. Караваева – <https://orcid.org/0000-0001-8231-6364>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; А. Н. Куликов – <https://orcid.org/0000-0002-4544-2967>;

С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; Н. В. Кириллова – <https://orcid.org/0000-0003-3379-0646>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 07.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является наиболее распространенной патологией печени в мире, а неалкогольный стеатогепатит является второй по частоте причиной для трансплантации печени среди взрослого населения. Актуальной задачей является поиск и разработка оптимальной модели НАЖБП на лабораторных животных, которая бы воспроизвела все особенности этого заболевания в клинике.

Цель. Модификация модели НАЖБП на лабораторных животных (крысы), позволяющей максимально полно транслировать полученные данные на человека.

Материалы и методы. Исследование проведено на 52 аутбредных белых крысах самцах одного возраста. В качестве основы модели была использована гиперкалорийная высокожировая диета с добавлением усилителей пищевой привлекательности (натрия глутамат и жидкий экстракт креветки) и впервые применены условия гиподинамии – ограничение двигательной активности животных с помощью специально разработанных клеток, в которых для каждой особи выделялась индивидуальная ячейка размерами 11 × 18 см. Длительность исследования составила 12 месяцев. В ходе эксперимента оценивали массу тела, физическую работоспособность, биохимические показатели сыворотки крови и мочи в динамике, регистрировали летальность. После окончания исследования анализировали массу внутренних органов, висцерального и эпидидимального жира, производили гистологическое исследование печени.

Результаты и обсуждение. В ходе экспериментального исследования гистологически подтверждено развитие НАЖБП у крыс контрольной группы животных. Выявленна высокая смертность в группе животных с патологией. По сравнению с животными интактной группы выявлены статистически значимое повышение их массы тела, массы печени, висцерального и эпидидимального жира, снижение физической работоспособности, нарушения в липидном, углеводном и белковом обменах, а также обнаружены признаки ухудшения белоксинтетической и выделительной функций печени.

Заключение. Выявлен ряд преимуществ модели НАЖБП при сочетании гиперкалорийной диеты и условий гиподинамии, в том числе схожесть условий формирования и патогенеза заболевания у экспериментальных животных и человека, что обеспечивает адекватность трансляции данных из доклинической практики в клиническую.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, гиперкалорийная диета, гиподинамия, аттрактанты, натрия глутамат, физическая работоспособность, висцеральный жир, эпидидимальный жир

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

Вклад авторов. А. В. Бунят, С. В. Оковитый, Д. Ю. Ивкин и А. Н. Куликов разработали план и осуществили экспериментальное исследование, произвели статистическую обработку и описание полученных результатов, участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов. В. Е. Карев осуществлял гистологическое исследование полученных образцов печени. О. М. Спасенкова, Н. В. Кириллова и А. В. Караваева производили биохимические исследования.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Бунят А. В., Спасенкова О. М., Карев В. Е., Караваева А. В., Ивкин Д. Ю., Куликов А. Н., Оковитый С. В., Кириллова Н. В. Модификация модели неалкогольной жировой болезни печени у крыс при сочетании гиперкалорийной диеты и гиподинамии. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4–1):155–165. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-155-165](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-155-165)

Modification of a Model of Non-alcoholic Fat Liver Disease in Rats with a Combination of a Hypercaloric Diet and Hypodynamia

Anna V. Bunyat^{1*}, Ol'ga M. Spasenkova², Vadim E. Karev³, Anna V. Karavaeva², Dmitrij Ju. Ivkin², Aleksandr N. Kulikov¹, Sergey V. Okovityi², Nadezhda V. Kirillova²

¹ V. A. Almazov NMRC, 2, Akkuratev str., Saint Petersburg, 197341, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

³ Federal Medical and Biological Agency Federal State Institution Scientific and Research Institute of Children's Infections, 9, Professor Popov str., St. Petersburg, 197022, Russia

*Corresponding author: Anna V. Bunyat. E-mail: tkaannavalera12@gmail.com

ORCID: Anna V. Bunyat – <https://orcid.org/0000-0002-4048-4754>; Ol'ga M. Spasenkova – <https://orcid.org/0000-0002-2924-7651>; Vadim E. Karev – <https://orcid.org/0000-0002-7972-1286>; Anna V. Karavaeva – <https://orcid.org/0000-0001-8231-6364>; Dmitrij Ju. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Aleksandr N. Kulikov – <https://orcid.org/0000-0002-4544-2967>; Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; Nadezhda V. Kirillova – <https://orcid.org/0000-0003-3379-0646>.

Received: 20.10.2021

Revised: 07.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease in the world, and non-alcoholic steatohepatitis is the second most common cause of liver transplantation in the adult population. An urgent task is to find and develop an optimal model of NAFLD in laboratory animals, which would reproduce all the features of this disease in the clinic.

Aim. Modification of the NAFLD model in laboratory animals (rats), which allows the obtained data to be transmitted to humans as fully as possible.

Materials and methods. The study was conducted on 52 outbred white male rats of the same age. As the basis of the model, a hypercaloric high-fat diet was used with the addition of food appeal enhancers (sodium glutamate and liquid shrimp extract) and for the first-time conditions of hypodynamia were used – restriction of the motor activity of animals using specially designed cells, in which an individual 11 × 18 cm cell was allocated for each individual. The duration of the study was 12 months. In the course of the experiment, body weight, physical performance, biochemical parameters of blood serum and urine in dynamics were assessed, and lethality was recorded. After the end of the study, the mass of internal organs, visceral and epididymal fat was analyzed, and a histological examination of the liver was performed.

Results and discussion. In the course of the experimental study, the development of NAFLD in rats of the control group of animals was histologically confirmed. A high mortality rate was revealed in the group of animals with pathology. Compared with animals of the intact group, a statistically significant increase in their body weight, liver weight, visceral and epididymal fat, a decrease in physical performance, disturbances in lipid, carbohydrate and protein metabolism were revealed, as well as signs of deterioration of the protein synthesis and excretory functions of the liver.

Conclusion. A number of advantages of the NAFLD model with a combination of a hypercaloric diet and hypodynamic conditions were revealed, including the similarity of the conditions for the formation and pathogenesis of the disease in experimental animals and humans, which ensures the adequacy of data translation from preclinical practice to clinical practice.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, hypercaloric diet, physical inactivity, attractants, sodium glutamate, physical performance, visceral fat, epididymal fat

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

Contribution of the authors. Anna V. Bunyat, Sergey V. Okovityi, Dmitrij Ju. Ivkin and Aleksandr N. Kulikov developed a plan and carried out an experimental study, performed statistical processing and a description of the results obtained, participated in writing the text of the article and discussing the results. Vadim E. Karev carried out a histological examination of the obtained liver samples. Ol'ga M. Spasenkova, Nadezhda V. Kirillova and Anna V. Karavaeva carried out biochemical studies.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Bunyat A. V., Spasenkova O. M., Karev V. E., Karavaeva A. V., Ivkin D. Ju., Kulikov A. N., Okovityi S. V., Kirillova N. V. Modification of a model of non-alcoholic fat liver disease in rats with a combination of a hypercaloric diet and hypodynamia. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):155–165. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-155-165](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-155-165)

ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – мультисистемное метаболическое заболевание, характеризующееся избыточной аккумуляцией липидов в гепатоцитах (более чем 5 % по результатам гистологического исследования). Основными причинами данного заболевания является высококалорийная диета – избыточное потребление насыщенных жиров, рафинированных углеводов, сахаросодержащих напитков, высокое потребление фруктозы в сочетании с недостаточной физической активностью [1, 2].

НАЖБП является наиболее распространенной патологией печени в мире. Ее глобальная распространённость составляет 25,24 % с самой высокой на Ближнем Востоке (31,79 %) и самой низкой в Африке (13,48 %) [3]. В Российской Федерации, согласно многоцентровому исследованию DIREG 2 с 2015 по

2017 годы наблюдается неуклонный рост заболеваемости НАЖБП у амбулаторных пациентов с 27 % до 37 %, что выводит ее на первое место среди заболеваний печени – 71,6 % [4]. Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) является второй ведущей причиной трансплантации печени среди взрослого населения [5]. Исходом заболевания является формирование фибротических изменений в тканях печени, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома.

Ключевыми подходами к лечению этой патологии являются физическая нагрузка и диета.

В данное время единой рекомендованной фармакотерапии НАЖБП не существует. Огромная роль в процессе разработки адекватной терапии данного заболевания принадлежит осуществлению доклинических исследований, а значит поиску и разработке оптимальной модели, которая бы воспроизвела все

особенности этого заболевания у человека на лабораторных животных.

Несмотря на то, что в литературе описано множество различных алиментарных [6–8] и генетических [9] моделей НАЖБП на животных, большинство исследователей признают, что единая модель, повторяющая все особенности этого заболевания у человека, все еще отсутствует.

Цель исследования – разработка модели НАЖБП на лабораторных животных (крысы), позволяющей максимально полно транслировать полученные данные в клинику.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводились согласно требованиям решения совета Евразийского экономического союза в Сфере обращения лекарственных средств от 03.11.2016 № 81, с одобрения биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, протокол БЭК NAFLD-Rats-2020 от 18.01.2020 г.

Основной эксперимент был проведен на 52 аутбредных белых крысах самцах одного возраста, полученных из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.) и прошедших 14-дневный карантин. Средняя масса животных на момент введения в эксперимент составляла 257 ± 27 г.

Максимально приближенная к НАЖБП у человека по этиопатогенезу модель позволит одинаково успешно оценивать эффективность гепатотропных средств как синтетического, так и животного/растительного происхождения [10].

За последнее время многочисленными исследованиями выявлено, что у человека основным этиологическим фактором и предиктором НАЖБП является образ жизни: высококалорийное питание, избыточное потребление насыщенных жиров, рафинированных углеводов, подслащенных сахаром напитков и малоподвижный образ жизни [1, 2], именно поэтому для создания модели в нашем экспериментальном исследовании были использованы все перечисленные условия, включая впервые использованные для этих целей условия гиподинамии.

Грызуны (мыши и крысы) являются оптимальной тест-системой для моделирования НАЖБП, причем, самцы более восприимчивы к алиментарным нарушениям, и у них легче и быстрее развивается данная патология по аналогии с людьми (у мужчин чаще, чем у женщин) [11]. Аутбредные животные были выбраны для простоты популяционной экстраполяции и трансляции данных.

НАЖБП моделировали по методу B. L. Xu et al. [12] с помощью гиперкалорийной диеты, создаваемой путем добавления к стандартному корму 20 % топленого говяжьего жира (ООО «Протеин»), 5 % d-фруктозы (ЗАО «Вектон»), 5 % изолированного соевого белка (ООО «Пьюр протеин»), 2 % холина (ЗАО «Вектон»), 0,5 % холестерина (ЗАО «Вектон»).

Опыт проведения исследований говорит о том, что результат моделирования при использовании высокожировой диеты зависит от характера добавляемого в него жира. Животные жиры эффективнее растительных формируют метаболические нарушения, при этом, свиной жир – стеатогепатит, а говяжий – стеатоз [13]. В связи с этим, в нашем исследовании мы отдали предпочтение говяжьему топленому жиру.

В качестве углеводной основы корма была выбрана фруктоза, так как ее потребление достаточно быстро вызывает ожирение печени с развитием резистентности к лептину как у животных [14], так и у человека [15].

Серьезной проблемой всех алиментарных моделей НАЖБП, основанных на повышении калорийности корма является недостаточное для моделирования патологии его потребление. В данной работе мы попытались решить эту проблему введением в состав корма усилителей пищевой привлекательности. После анализа литературы о пищевых предпочтениях грызунов нами было проведено мини-исследование по подбору оптимального аттрактанта. Животные были рандомизированы на 5 групп: контрольная группа получала стандартный корм, опытным группам добавлялся натрия глютамат (1 % от общей массы корма) и одно из следующих веществ (по 1 % от общей массы корма): жареный сушеный репчатый лук, жидкий экстракт креветок, масло аниса. Каждой крысе был обеспечен свободный доступ к воде.

Влияние глютамата натрия на массу тела крыс уже рассматривалось отечественными учеными, при этом было выявлено, что животные, потребляющие данную добавку в дозе 30 мг/кг прибавляли в течение месяца 43 % от первоначального веса [16].

В ходе исследования было выявлено, что все заявленные вещества значимо повышают суточное потребление корма животными по сравнению с контрольной группой, однако наибольшее потребление из всех наблюдали в группе с экстрактом креветки (в 1,9 раза по сравнению с группой на стандартном корме), поэтому он, вместе с глютаматом натрия, был выбран для дальнейших исследований в качестве аттрактанта.

Учитывая, что наряду с гиперкалорийным питанием, гиподинамия является одним из важнейших факторов риска развития НАЖБП, в использованную модель было введено ограничение двигательной активности животных с помощью специально разработанных клеток, в которых для каждой крысы выделялась индивидуальная ячейка размерами 11×18 см.

Все животные методом случайных чисел были рандомизированы на 2 группы, сформированные из особей, сопоставимых по массе тела: интактная группа включала 11 крыс, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде; контрольная группа включала 41 животное на гиперкалорийной диете в условиях гиподинамии.

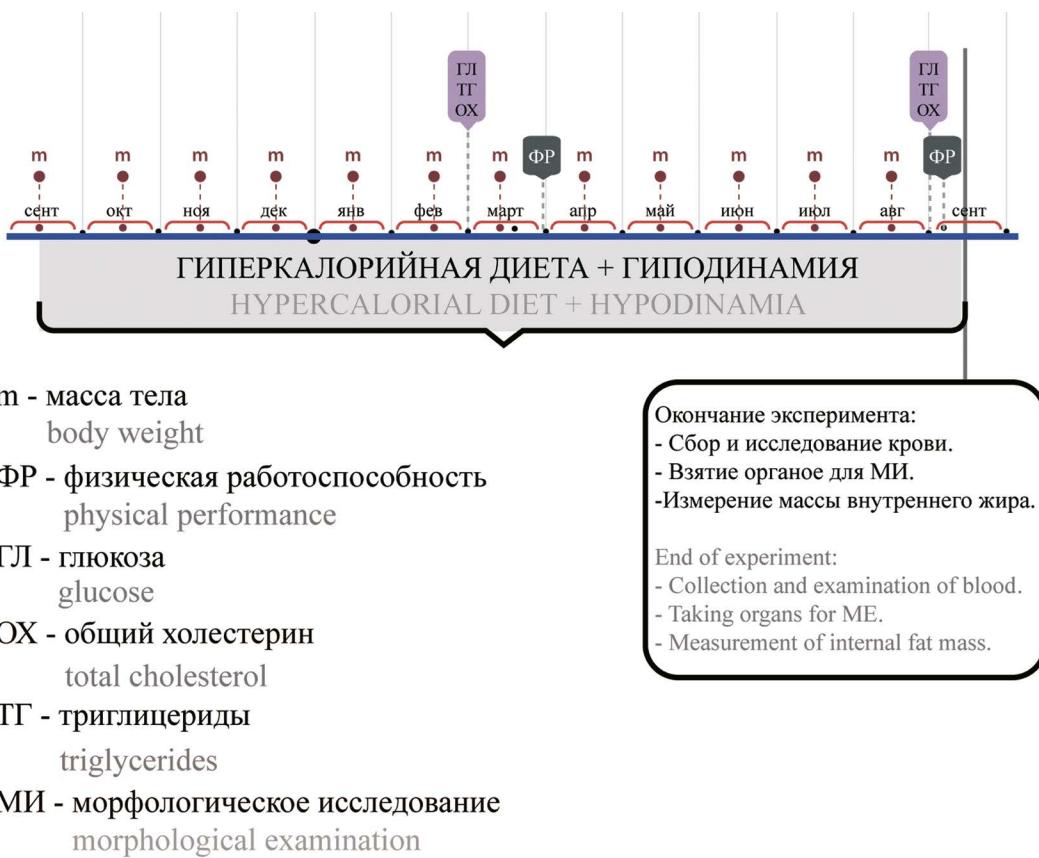


Рисунок 1. Протокол эксперимента

Figure 1. Experiment protocol

Общая продолжительность эксперимента составила 12 месяцев. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

В ходе исследования всем животным ежемесячно измеряли массу тела с помощью электронных весов.

В контрольных точках эксперимента (180-й и 360-й дни исследования) оценивали физическую работоспособность с помощью тредмила (Treadmill System for rats, TSE, Германия) после предварительного обучения. Скорость движения транспортерной ленты – 0,7 м/сек, угол наклона – 15°. Критерием полного утомления животного служило отсутствие реакции крысы на удар током 6 мА. Регистрировали время окончания бега в секундах, затем животное удаляли с транспортера [17].

Уровень глюкозы, общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови измеряли портативными анализаторами [Accu-Chek Active (Roche) и Accutrend Plus (Cobas)] после предварительного 8-ми часового голодания животных, путем забора крови из латеральной хвостовой вены в контрольных точках.

После вывода предварительно наркотизированных животных из эксперимента методом декапитации собирали кровь, в пробирки с активатором свертывания крови. После 30-минутного отстаивания кровь центрифугировали в течение 5 минут на 1000 об/мин, затем в течение 15 минут на 3000 об/мин. Отделенную сыворотку изучали на биохимической

анализаторе Stat Fax 1904+ (Awareness Technology, США) и Эрба Лахема (Erba Lachema, Чехия). Определяли активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы (АлАТ и АсАТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), уровень креатинина, сывороточного альбумина и общего белка.

Внутренние органы и жировые депо (висцеральный и эпидидимальный жир) извлекались и производилось их взвешивание.

Также, перед окончанием эксперимента проводили сбор суточной мочи путем помещения животных в метаболические клетки. Измеряли объем мочи и с помощью анализатора мочи CL-50 HTI (тест-полоски UrinesRS H10 (H. Technology, Inc.) определяли наличие и количество белка, уробилиногена и билирубина.

Для гистологического исследования органы с предварительно измеренной массой на 24 часа помещали в 10 % раствор формалина с последующим приготовлением срезов и их окраской гематоксилином и эозином. В печени оценивали следующие признаки – выраженность некроза, лобулярного воспаления и баллонной дистрофии.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ GraphPad Prism 7. Осуществляли проверку на нормальность распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-крите-

рия Шапиро – Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью *t*-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при распределении, не удовлетворяющем критериям нормальности распределения – с помощью непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Сопоставление частотных характеристик качественных показателей проводилось с помощью непараметрического критерия Фишера. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (*M*) \pm стандартная ошибка среднего (*m*). Критерием статистической достоверности получаемых выводов мы считали общепринятую в медицине величину *p* $< 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Золотым стандартом диагностики неалкогольной жировой болезни печени является биопсия печени с последующим гистологическим исследованием [1, 2].

В группе интактных животных патологических изменений выявлено не было. В группе контрольных животных у 62,5 % животных выявлены морфологические признаки неалкогольной жировой болезни печени (рисунок 2).

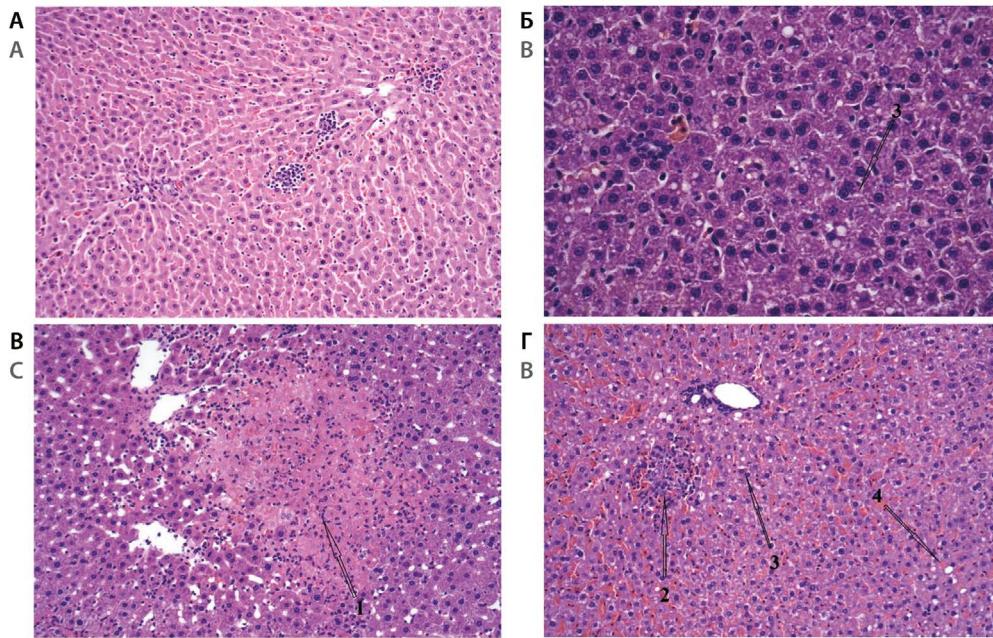


Рисунок 2. Гистологические препараты печени. (окраска – гематоксилин-эозин). Увеличение x200.

А – препарат печени из группы интактных животных. Печень с сохраненным дольковым и балочным строением; Б–Г – препараты печени из группы контрольных животных – мультилобулярные крупно- (1) и мелкоочаговые (2) некрозы ткани печени диффузный слабо выраженный гранулематозный гепатит с участками мелко- (3) и среднекапельного (4) стеатоза

Figure 2. Histological preparations of the liver. (color – hematoxylin-eosin). Magnification x200.

A – Liver preparation from the group of intact animals. Liver with preserved lobular and bar structure; B–D – liver preparations from the group of control animals – multilobular large (1) and small focal (2) necrosis of liver tissue, diffuse mild granulomatous hepatitis with areas of small (3) and medium (4) steatosis

Используемая нами модель НАЖБП характеризовалась высокой смертностью. Так, первые эпизоды смертей животных начали регистрироваться с 7-го месяца исследования. К концу эксперимента процент выживших животных в контрольной группе составил 28,6 %, при наличии 100 % выживаемости в интактной группе (*p* $< 0,05$) (рисунок 3).

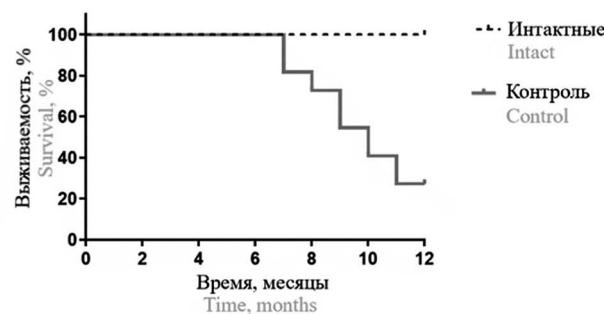


Рисунок 3. График выживаемости (по Каплану – Мейеру)

Figure 3. Survival chart (Kaplan – Meier)

Показатель смертности при НАЖБП, особенно при наличии фибротических изменений в печени, превышает аналогичный показатель в общей популяции [1].

Данные о летальности лабораторных животных в алиментарных моделях стеатоза печени немногочисленны. В основной массе источников она

или не отмечалась, или такие результаты не были приведены.

При анализе динамики массы тела лабораторных животных выявлено статистически значимое ее повышением в группе контроля (рисунок 4).

Так, масса тела у животных контрольной группы на 6-м месяце диеты увеличилась в 1,7 раза по сравнению с исходной и в 1,2 раза превышала значения интактной группы, а к концу эксперимента увеличилась в 1,7 раза ($p < 0,05$).

В исследовании, где животные, получали гиперкалорийную диету с примерно равным соотношением жиров и углеводов (25,52 % и 20,1 % соответственно) к концу первого месяца исследования значимо прибавляли 40 % от первоначальной массы тела [18].

Учитывая литературные данные, повышение веса крыс в нашем исследовании происходило достаточно постепенно – к концу эксперимента разница между интактными особями и контрольной группой составляла в среднем 29 %. Это может объясняться тем, что мы использовали относительно небольшое количество углеводов, а также, учитывая изоляцию особей друг от друга, особи контрольной группы находились в условиях повышенного стресса, что могло влиять на количество потребляемой пищи, снижая его.

После 6-месячного моделирования патологии и в конце эксперимента изучали параметры физической работоспособности. Повышение массы тела у контрольной группы животных привело к ухудшению параметров их физической активности (таблица 1).

Среднее время нахождения животного на дорожке тредмила, а также пройденное расстояние у контрольной группы после 6-и месячного моделирования ожирения было в 1,93 раза и в 1,66 раза ниже значения интактной группы соответственно ($p < 0,05$). Дальнейшее наблюдение показало, что работоспособность контрольной группы ухудшилась по сравнению с показателями на 6-м месяце – среднее расстояние, пройденное животными на тредмиле снизилось в 1,3 раза ($p < 0,05$), при этом время бега не изменилось.

Ухудшение физической работоспособности в нашем исследовании, очевидно, связано не только с повышением массы тела, но и с длительным нахождением в условиях гиподинамии, что само по себе снижает адаптацию к физическим нагрузкам. Сходные данные, свидетельствующие о снижении физической работоспособности, были получены и на других экспериментальных моделях НАЖБП [19].

Анализ ключевых биохимических показателей сыворотки крови исследуемых групп животных выявил наличие нарушений липидного, углеводного, а также белкового обменов у контрольной группы.

Нарушения липидного обмена проявлялись синдромом дислипидемии, а именно: гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией у контрольной группы животных, нарастающими на протяжении всего эксперимента. При этом в показателях интактной группы никаких значимых колебаний данных показателей не наблюдалось (таблица 2).

Отмечено, что средний уровень триглицеридов (ТГ) животных через 6 и 12 месяцев пребывания на гиперкалорийной диете в условиях гиподинамии в 1,8

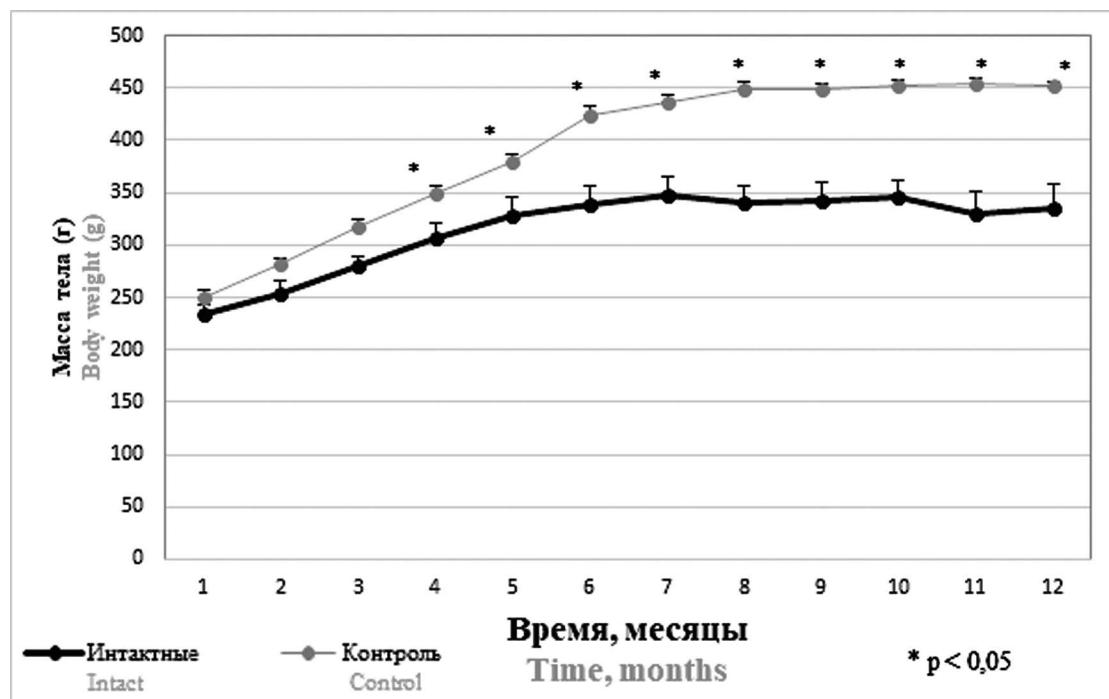


Рисунок 4. Динамика массы тела у исследуемых групп животных на протяжении эксперимента

Figure 4. Dynamics of body weight in the studied groups of animals during the experiment

Таблица 1. Показатели физической работоспособности животных в контрольных точках эксперимента ($M \pm m$)

Table 1. Indicators of physical performance of animals at the control points of the experiment ($M \pm m$)

Группа Group	6-й месяц 6th month		12-й месяц 12th month	
	Время бега (сек) Running time (sec)	Пройденное расстояние (м) Distance traveled (m)	Время бега (сек) Running time (sec)	Пройденное расстояние (м) Distance traveled (m)
Интактные Intact	141,8 ± 5,5	284 ± 8,15	146,17 ± 6,45	276,17 ± 9,68
Контроль Control	73,43 ± 3,98 ¹	171,67 ± 8,22 ¹	81,8 ± 7,43 ¹	132,0 ± 11,7 ^{1,2}

Примечание. ¹ Различия ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой; 2 – различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (6-й месяц).

Note. ¹ Differences ($p < 0.05$) compared with the intact group; 2- differences ($p < 0.05$) compared with the control group (6th month).

Таблица 2. Показатели липидного обмена и сывороточной глюкозы у исследуемых животных ($M \pm m$)

Table 2. Indicators of lipid metabolism and serum glucose in the studied animals ($M \pm m$)

Показатель/Группа Indicator/Group	Интактные Intact		Контроль Control	
	6-й месяц 6th month	12-й месяц 12th month	6-й месяц 6th month	12-й месяц 12th month
Общий холестерин (ммоль/л) Total cholesterol (mmol/L)	2,17 ± 0,16	2,26 ± 0,13	2,89 ± 0,15 [*]	3,16 ± 0,14 [*]
Триглицериды (ммоль/л) Triglycerides (mmol/L)	1,15 ± 0,05	1,14 ± 0,19	2,06 ± 0,06 [*]	2,21 ± 0,28 [*]
Глюкоза (ммоль/л) Glucose (mmol/L)	4,76 ± 0,12	4,19 ± 0,14	5,67 ± 0,09 [*]	5,80 ± 0,23 [*]

Примечание. ^{*} Различия ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой.

Note. ^{*} Differences ($p < 0.05$) compared with the intact group.

и в 1,94 раза превышал уровень интактной группы соответственно ($p < 0,05$).

Аналогичная тенденция наблюдалась при анализе уровня общего холестерина (ОХ) сыворотки крови. Показатель группы животных с патологией через 6 и 12 месяцев эксперимента превышал показатель интактной в 1,3 и 1,4 раза соответственно ($p < 0,05$).

При исследовании уровня трансаминаз перед окончанием исследования (12-й месяц), выявлена тенденция к повышению концентраций АсАТ и АлАТ сыворотки крови контрольной группы животных по сравнению с интактной группой, однако отличия статистически не значимы.

Влияние НАЖБП на показатели липидного обмена различно и зависит от морфологической формы заболевания, возраста пациентов, а также наличия сопутствующих заболеваний и синдромов. Как правило, стеатоз печени не проявляется изменениями в биохимических показателях крови. При этом, стеатогепатит часто проявляется сдвигами в липидограмме. Кроме того, некоторые исследования показывают прямую зависимость уровней ОХ и ТГ сыворотки крови от степени НАЖБП [20].

Также, изменения биохимических показателей крови могут быть связаны с преобладанием тех или иных веществ в диете. В исследованиях с выраженным

преобладанием углеводов в диете у животных [21] уровень ТГ и ОХ повышался, в исследованиях с преобладанием жирового компонента диеты [6] наоборот, наблюдалась тенденция к снижению их концентраций.

Многие исследования подчеркивают связь между НАЖБП и несколькими факторами метаболического синдрома, включая абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность (ИР) и дислипидемию (гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, или их сочетание) [22]. Содержание жира в печени отражает равновесие между липолизом, окислением жирных кислот, липогенезом *de novo* и секрецией липопротеидов очень низкой плотности ЛПОНП. Накопление ТГ в печени, вероятно, является следствием избыточного окисления жирных кислот и секреции ЛПОНП, поскольку оба этих пути активируются у пациентов с НАЖБП [23]. Абдоминальное ожирение (преимущественно за счет висцерального жира), вызывая и сочетаясь с инсулинорезистентностью, вызывает изменения активности липопротеинлипазы и снижение уровня альфа-глицерофосфата в клетках жировой ткани и приводят к дефициту энергии и активации липолиза. Выделившиеся таким образом свободные жирные кислоты (СЖК) транспортируются в печень, где преобразуются в ТГ. Накопление триглицеридов

в печени сопровождается нарушением энергетического обмена и способности инсулина подавлять продукцию глюкозы и ЛПОНП, что приводит к гипергликемии, гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии [24]. Таким образом, можно предположить, что в условиях инсулинерезистентности активация липолиза (в частности, от увеличения массовой доли висцерального жира), вызывает перегрузку печени глицерином и СЖК, что компенсаторно усиливает синтез ТГ и глюконеогенез (где глицерин используется посредством бета-окисления в качестве глюконеогенного субстрата, а СЖК обеспечивают этот процесс молекулами АТФ).

Уровень гликемии половозрелой крысы в норме колеблется в диапазоне 2,75–5,51 ммоль/л (50–100 мг/дл) [25]. На нашей модели, уровень глюкозы контрольной группы животных на 6-м и 12-м месяце исследования статистически значимо превышал таковой интактной группы животных (в 1,19 и 1,4 раза ($p < 0,05$), однако выхода за пределы физиологической нормы не наблюдалось. Изменений концентрации глюкозы сыворотки в крови интактных животных на протяжении эксперимента не отмечалось (таблица 2).

Развитие гипергликемии описано во множестве моделей НАЖБП при использовании гиперкалорийной диеты, насыщенной фруктозой. Так, добавление 10 % фруктозы в питьевую воду в 12-ти недельном эксперименте на крысах линии Wistar, приводило к возникновению гипергликемии на фоне сопутствующего ожирения и нарушений липидного обмена [25]. При увеличении концентрации фруктозы в питьевой воде до 20 % подобные результаты регистрировались уже через 8 недель исследования [26].

Кроме того, в литературе описана отчетливая корреляция между той или иной формой экспериментальной НАЖБП и колебаниями уровня глюкозы в крови. Так, при преобладании стеатогепатита уровень глюкозы имеет тенденцию повышаться, а при преобладании стеатоза значительно не изменяется [21].

Было выявлено снижение сывороточного уровня альбуминов контрольной группы животных по сравнению с интактными в 1,3 раза ($p < 0,05$), а также значительное повышение у них уровня креатинина по сравнению с интактными в 2,9 раза ($p < 0,05$) (рисунок 5).

Снижение концентрации сывороточного альбумина может говорить о нарушении белоксинтетической функции печени [27] и подтверждается наличием у большинства особей многочисленных воспалительно-некротических изменений в печени по результатам морфологического исследования.

Гипоальбуминемия не является характерным признаком НАЖБП, но может появляться на поздней стадии стеатогепатита или при циррозе. По мнению некоторых исследователей, повышенная продукция фактора некроза опухоли альфа, являясь частым звеном патогенеза различных форм НАЖБП приводит к дефициту полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и гипоальбуминемии. Альбумин же мобилизует ПНЖК из печени и других тканей и может способствовать активации образования противовоспалительных цитокинов, резольвинов, протектинов и простаглана-дина Е1. Все это подавляет реакцию образования свободных радикалов (активных форм кислорода), вызванную воспалительным процессом [28]. Таким образом, возникновение гипоальбуминемии при НАЖБП является своего рода порочным кругом.

Выявление повышения концентрации сывороточного креатинина у контрольной группы животных, а также наличие протеинурии (рисунок 6), может говорить о повреждении и снижении функции почек.

Обсуждая возможные взаимосвязи между НАЖБП и формированием хронической болезни почек (ХБП), до сих пор неясно, является ли ХБП следствием кардиометаболических факторов риска или НАЖБП вносит свой вклад. Одним из возможных факторов, связывающих НАЖБП, альбуминурию и ИР, является ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС). Адипоциты экспрессируют все компоненты РААС, включая ангиотензин II, ангиотензин-превращающий

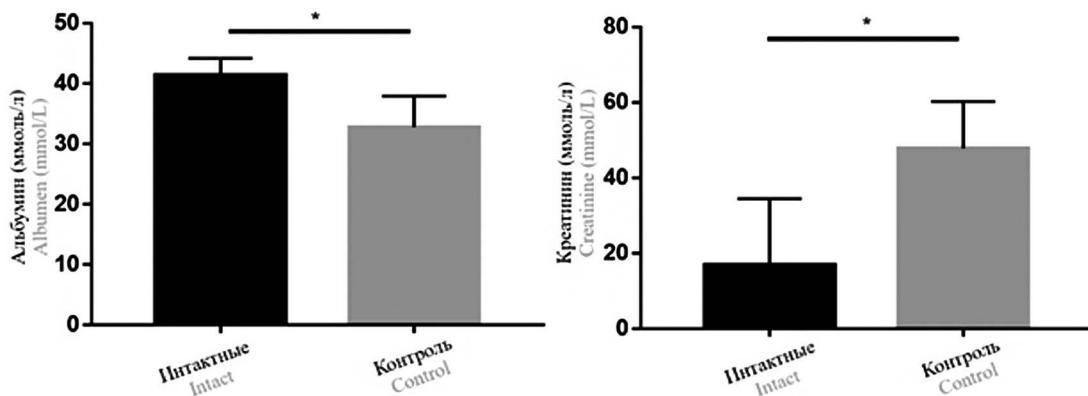


Рисунок 5. Показатели альбумина и креатинина в сыворотке крови исследуемых групп животных на 12-м месяце исследования ($M \pm m$)

Figure 5. Indicators of albumin and creatinine in the blood serum of the studied groups of animals at the 12th month of the study ($M \pm m$)

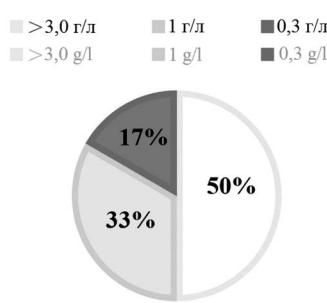


Рисунок 6. Уровень протеинурии у животных контрольной группы

Figure 6. The level of proteinuria of the control group of animals

фермент (АПФ), ренин и рецепторы ангиотензина II первого и 2-го типов. Также, известно, что атероген- ная дислипидемия способствует развитию ХБП через рецепторно-опосредованное поглощение качествен- но аномальных липопротеинов клубочковыми и тубу- лоинтерстициальными клетками [29].

Кроме того, было выявлено, что в моче контроль- ных животных повышался уровень пигментов: уро- билиногена до $55,0 \pm 7,62$ ммоль/л; билирубина до $43,13 \pm 20,15$ ммоль/л ($M \pm m$). При этом у интактных животных в моче они отсутствовали. Это может сви- детельствовать о нарушении выделительной функции печени.

Жировая ткань у крыс представлена подкожной и висцеральной жировой тканью (включает мезенте- риальную, забрюшинную и эпидидимальную). При- чем у грызунов в норме эпидидимальная жировая ткань имеет большую массу, чем в других локализа- циях [30]. Повышение массовой доли висцерального жира является характерной чертой метаболическо- го синдрома как у людей [31], так и у животных [32], и является одним из важнейших прогностических фак-

торов развития заболеваний, ассоциированных с ожире- нием [33].

Нами было отмечено значительное накопление висцерального жира в организме лабораторных живо- тных. Так, средняя масса висцерального и эпи- дидимального жира контрольной группы животных в 3,98 и 1,83 раза соответственно превышала массу интактной группы ($p < 0,05$) (рисунок 7).

Масса печени контрольной группы животных в 1,33 раза превышала массу печени интактной груп- пы ($p < 0,05$). Масса сердца опытных групп живот- ных несколько превышала таковую интактной группы животных, однако отличия были статистически не значимы. Подобная тенденция наблюдалась при ана- лизе массы почек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, модифицированная модель НАЖБП у крыс характеризуется не только схожестью усло- вий формирования (гиперкалорийное питание, ги- подинамия, развитие висцерального ожирения), но и морфологическими (признаки стеатогепатита) и био- химическими (дислипидемия, гипергликемия) прояв- лениями. Это потенциально повышает адекватность трансляции данных, получаемых на такой модели, из доклинической практики в клиническую. Однако, зна- чимым недостатком модифицированной модели яв- ляется высокая продолжительность формирования патологии, и как следствие – ее трудозатратность.

ЛИТЕРАТУРА

- European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;64(6):1388–1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.
- Лазебник Л. Б., Голованова Е. В., Туркина С. В., Райхельсон К. Л., Оковитый С. В., Драпкина О. М., Маев И. В., Мартынов А. И., Ройтберг Г. Е., Хлынова О. В., Абдулганиева Д. И., Алексеен-

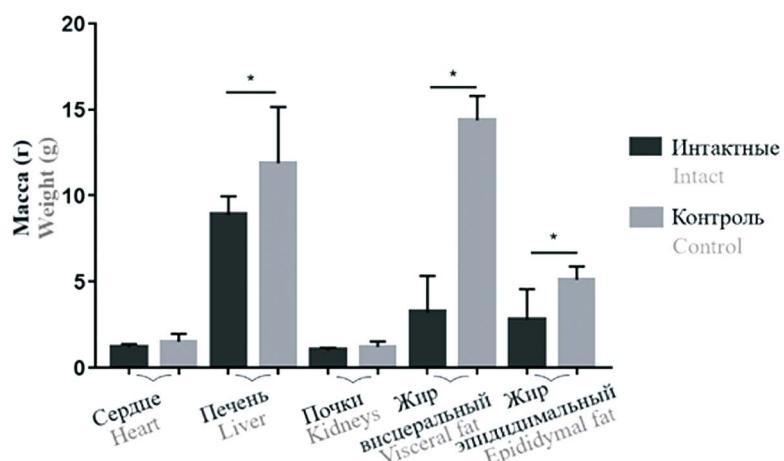


Рисунок 7. Масса внутренних органов, висцерального и эпидидимального жира экспериментальных животных ($M \pm m$)

Figure 7. Mass of internal organs, visceral and epididymal fat of experimental animals ($M \pm m$)

- ко С. А., Ардатская М. Д., Бакулин И. Г., Бакулина Н. В., Буеверов А. О., Виницкая Е. В., Волынец Г. В., Еремина Е. Ю., Гриневич В. Б., Долгушина А. И., Казюлин А. Н., Кашкина Е. И., Козлова И. В., Конев Ю. В., Корочанская Н. В., Кравчук Ю. А., Ли Е. Д., Лоранская И. Д., Махов В. М., Мехтиев С. Н., Новикова В. П., Остроумова О. Д., Павлов Ч. С., Радченко В. Г., Самсонов А. А., Сарсенбаева А. С., Сайфутдинов Р. Г., Селиверстов П. В., Ситкин С. И., Стефанюк О. В., Тарасова Л. В., Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П., Фоминых Ю. А., Хавкин А. И., Цыганова Ю. В., Шархун О. О. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;1(1):4–52. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52.
3. Cariou B., Byrne C. D., Loomba R., Sanyal A. J. Nonalcoholic fatty liver disease as a metabolic disease in humans: A literature review. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2021;23(5):1069–1083. DOI: 10.1111/dom.14322.
4. Драпкина О. М., Ивашкин В. Т. Эпидемиологические особенности неалкогольной жировой болезни печени в России (результаты открытого многоцентрового проспективного исследования наблюдения DIREGL 01903). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014;24(4):32–38.
5. Cotter T. G., Charlton M. Nonalcoholic steatohepatitis after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2020;26(1):141–159. DOI: 10.1002/lt.25657.
6. Оковитый С. В., Шустов Е. Б., Белых М. А., Кириллова Н. В., Спасенкова О. М., Иванов А. Г., Караваева А. В., Ткачева А. В. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных. *Биомедицина*. 2018;4:29–43.
7. Le K. A., Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2006;9(4):469–475. DOI: 10.1097/01.mco.0000232910.61612.4d.
8. Panchal S. K., Poudyal H., Iyer A., Nazer R., Alam A., Diwan V., Kauter K., Sernia C., Campbell F., Ward L., Gobe G., Fenning A., Brown L. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2011;57(5):611–624. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181fe90a.
9. Michaelis O. E., Ellwood K. C., Judge J. M., Scoene N. W., Hansen C. T. Effect of dietary sucrose on the SHR/N-corpulent rat: a new model for insulin-independent diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1984;39(4):612–618. DOI: 10.1093/ajcn/39.4.612.
10. Zhong F., Zhou X., Xu J., Gao L. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestion*. 2020;101(5):522–535. DOI: 10.1159/000501851.
11. Макарова М. Н., Макаров В. Г. Диет-индуцированные модели метаболических нарушений. Сообщение 4: экспериментальная неалкогольная жировая болезнь печени. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;4:41–49. DOI: 10.29296/2618723X_2018-04-04.
12. Xu B. L., Wang R., Ma L., Dong W., Zhao W., Zhang Z., Wang J., Zhang X. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. *BioMed Research International*. 2015;2(1):1–7. DOI: 10.1155/2015/759803.
13. Wang H. Y., Zheng Y., Wang G. L., Li H. X. Identification of microRNA and bioinformatics target gene analysis in beef cattle intramuscular fat and subcutaneous fat. *Molecular BioSystems*. 2013;9(8):2154–2162. DOI: 10.1039/c3mb70084d.
14. Spruss A., Kanuri G., Wagnerberger S., Haub S., Bischoff S. C., Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094–1104. DOI: 10.1002/hep.23122.
15. Wang D., Sievenpiper J. L., de Souza R. J., Cozma A. I., Chiavaroli L., Ha V., Mirrahimi A., Carleton A. J., Buono M. D., Jenkins A. L., Leiter L. A., Wolever T. M. S., Beyene J., Kendall C. W. C., Jenkins D. J. A. Effect of fructose on postprandial triglycerides: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):125–133. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.019.
16. Дерхю М. А., Середа Т. И., Голобородько Г. Н. Влияние глутамата натрия на массу тела и внутренних органов крыс. Фундаментальные проблемы науки. Уфа: РИО МЦИИ ОМЕГА САЙНС; 2015. 142 с.
17. Куликов А. Н., Оковитый С. В., Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Лисицкий Д. С., Любишин М. М. Эффекты эмпаглифлозина при экспериментальной модели хронической сердечной недостаточности у крыс с нормогликемией. *Журнал Сердечная Недостаточность*. 2016;17(6):454–460. DOI: 10.18087/rhfj.2016.6.2289.
18. Давыдов В. В., Медведев Д. В., Шодиев Д. Р., Некрасова М. С. Влияние нарушения светового режима на липидный обмен и функциональные показатели у интактных крыс и животных с алиментарным ожирением. *Наука Молодых (Eruditio Juvenium)*. 2017;2:175–184.
19. Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Поверяева М. А., Бунят А. В., Карев В. Е., Ивкин Д. Ю., Суханов Д. С., Шустов Е. Б., Оковитый С. В. Оценка влияния L-орнитина L-аспартата и эмпаглифлозина на физическую работоспособность при экспериментальном стеатогепатите. *Биомедицина*. 2020;16(3):77–80. DOI: 10.33647/2074-5982-16-3-77-80.
20. Khalil F., Nabil Rafat M., Salah V., Attia M., Ibrahim W. Study of lipid profile in different grades of non-alcoholic fatty liver disease. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2018;73(8):7388–7393.
21. Трашков А. П., Брус Т. В., Васильев А. Г., Артеменко М. Р., Печатникова В. А., Гуменная М. А. Биохимический профиль крыс с неалкогольной жировой болезнью печени различной степени тяжести и его коррекция препаратом ремаксол. *Лицей*. 2017;8(4):78–85. DOI: 10.17816/PED8478-85.
22. Souza M. R., Diniz M. F., Medeiros-Filho J. E., Araujo M. S. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2012;49(1):89–96. DOI: 10.1590/s0004-28032012000100015.
23. Adiels M., Taskinen M. R., Packard C., Caslake M. J., Soro-Paavonen A., Westerbacka J., Vehkavaara S., Hakkinen A., Olofsson S. O., Yki-Jarvinen H., Boren J. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia*. 2006;49(4):755–765. DOI: 10.1007/s00125-005-0125-z.
24. Gaggini M., Morelli M., Buzzigoli E., DeFrondo R. A., Bugianesi E., Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5(5):1544–1560. DOI: 10.3390/nu5051544.
25. Mahmoud A. A., Elshazly S. M. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One*. 2014;9(9):e106993. DOI: 10.1371/journal.pone.0106993.
26. Mamikutty N., Thent Z. C., Sapri S. R., Sahrudin N. N., Mohd Y. M. R., Haji S. F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*. 2014;2014:263897. DOI: 10.1155/2014/263897.
27. D'Amico G., Garcia-Tsao G., Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology*. 2006;44(1):217–231. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.10.013.
28. Undurti N. D. Beneficial role of bioactive lipids in the pathobiology, prevention, and management of HBV, HCV and alcoholic hepatitis, NAFLD, and liver cirrhosis: A review. *Journal of Advanced Research*. 2019;17:17–29. DOI: 10.1016/j.jare.2018.12.006.
29. Gyebi L., Soltani Z., Reisin E. Lipid nephrotoxicity: new concept for an old disease. *Current hypertension reports*. 2012;14(2):177–181. DOI: 10.1007/s11906-012-0250-2.
30. Sackmann-Sala L., Berryman D. E., Munn R. D., Kopchick J. J. Heterogeneity among white adipose tissue depots in male c57bl/6j mice. *Obesity*. 2012;20(1):101–111. DOI: 10.1038/oby.2011.235.
31. Азимова М. О., Блинова Н. В., Жернакова Ю. В., Чазова И. Е. Ожирение как предиктор сердечно-сосудистых заболеваний: роль локальных жировых депо. *Системные Гипертензии*. 2018;15(3):39–43. DOI: 10.26442/2075-082X_2018.3.39-43.
32. Rocha-Rodrigues S., Rodriguez A., Becerril S., Ramirez B., Goncalves I., Beleza J., Fruhbeck G., Ascensao A., Magalhaes J. Physical exercise remodels visceral adipose tissue and mitochondrial lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2017;44(3):386–394. DOI: 10.1111/1440-1681.12706.
33. Бутрова А. С., Дзгоева Ф. Х. Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома. *Ожирение и метаболизм*. 2004;1:10–16.

REFERENCES

1. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic

- fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;64(6):1388–1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.
2. Lazebnik L. B., Golovanova E. V., Turkina S. V., Raikhelson K. L., Okovityy S. V., Drapkina O. M., Maev I. V., Martynov A. I., Roitberg G. E., Khlyanova O. V., Abdulganieva D. I., Alekseenko S. A., Ardatskaya M. D., Bakulin I. G., Bakulina N. V., Bueverov A. O., Vinitskaya E. V., Volynets G. V., Eremina E. Yu., Grinevich V. B., Dolgushina A. I., Kazyulin A. N., Kashkina E. I., Kozlova I. V., Konnev Yu. V., Korochanskaya N. V., Kravchuk Yu. A., Li E. D., Loranskaya I. D., Makhov V. M., Mekhtiev S. N., Novikova V. P., Ostroumova O. D., Pavlov Ch. S., Radchenko V. G., Samsonov A. A., Sarsenbaeva A. S., Sayfutdinov R. G., Seliverstov P. V., Sitkin S. I., Stefanuk O. V., Tarasova L. V., Tkachenko E. I., Uspensky Yu. P., Fominykh Yu. A., Khavkin A. I., Tsyganova Yu. V., Sharhun O. O. Non-alcoholic fatty liver disease in adults: clinical picture, diagnosis, treatment. Guidelines for therapists, third version. *Jeksperimental'naja i Klinicheskaja Gastroenterologija = Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;1(1):4–52. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52.
 3. Cariou B., Byrne C. D., Loomba R., Sanyal A. J. Nonalcoholic fatty liver disease as a metabolic disease in humans: A literature review. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2021;23(5):1069–1083. DOI: 10.1111/dom.14322.
 4. Drapkina O. M., Ivashkin V. T. Epidemiological features of non-alcoholic fatty liver disease in Russia (results of an open multicenter prospective observation study DIREGL 01903). *Rossijskij Zhurnal Gastroenterologii, Hepatologii, Koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2014;24(4):32–38. (In Russ.)
 5. Cotter T. G., Charlton M. Nonalcoholic steatohepatitis after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2020;26(1):141–159. DOI: 10.1002/lt.25657.
 6. Okovityy S. V., Shustov E. B., Belyh M. A., Kirillova N. V., Spasenova O. M., Ivanov A. G., Karavaeva A. V., Tkacheva A. V. Modeling of non-alcoholic hepatic steatosis: features of metabolic changes in the body of laboratory animals. *Biomeditsina = Journal Biomed.* 2018;4:29–43. (In Russ.)
 7. Le K. A., Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2006;9(4):469–475. DOI: 10.1097/01.mco.0000232910.61612.4d.
 8. Panchal S. K., Poudyal H., Iyer A., Nazer R., Alam A., Diwan V., Kauter K., Sernia C., Campbell F., Ward L., Gobe G., Fenning A., Brown L. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2011;57(5):611–624. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181feb90a.
 9. Michaelis O. E., Ellwood K. C., Judge J. M. Scoene N. W., Hansen C. T. Effect of dietary sucrose on the SHR/N-corpulent rat: a new model for insulin-independent diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1984;39(4):612–618. DOI: 10.1093/ajcn/39.4.612.
 10. Zhong F., Zhou X., Xu J., Gao L. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestion*. 2020;101(5):522–535. DOI: 10.1159/000501851.
 11. Makarova M. N., Makarov V. G. Diet-induced models of metabolic disorders. Report 4: Experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnyh issledovanij*. 2018;4:41–49. (In Russ.) DOI: 10.29296/2618723X-2018-04-04.
 12. Xu B. L., Wang R., Ma L., Dong W., Zhao W., Zhang Z., Wang J., Zhang X. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. *BioMed Research International*. 2015;2(1):1–7. DOI: 10.1155/2015/759803.
 13. Wang H. Y., Zheng Y., Wang G. L., Li H. X. Identification of microRNA and bioinformatics target gene analysis in beef cattle intramuscular fat and subcutaneous fat. *Molecular BioSystems*. 2013;9(8):2154–2162. DOI: 10.1039/c3mb70084d.
 14. Spruss A., Kanuri G., Wagnerberger S., Haub S., Bischoff S. C., Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094–1104. DOI: 10.1002/hep.23122.
 15. Wang D., Sievenpiper J. L., de Souza R. J., Cozma A. I., Chiavaroli L., Ha V., Mirrahimi A., Carleton A. J., Buono M. D., Jenkins A. L., Leiter L. A., Wolever T. M. S., Beyene J., Kendall C. W. C., Jenkins D. J. A. Effect of fructose on postprandial triglycerides: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):125–133. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.019.
 16. Derho M. A., Sereda T. I., Goloborod'ko G. N. Effect of monosodium glutamate on body weight and internal organs of rats. *Fundamental'nye problemy nauki*. Ufa: RIO MTsII OMEGA SAYNS; 2015. 142 p. (In Russ.)
 17. Kulikov A. N., Okovityy S. V., Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Lisickij D. S., Ljubishin M. M. Effects of empagliflozin in an experimental model of chronic heart failure in rats with normoglycemia. *Zhurnal Serdechnaja Nedostatochnost'*. 2016;17(6):454–460. (In Russ.) DOI: 10.18087/rhfj.2016.6.2289.
 18. Davydov V. V., Medvedev D. V., Shodiev D. R., Nekrasova M. S. Influence of violation of the light regime on lipid metabolism and functional parameters in intact rats and animals with alimentary obesity. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)*. 2017;2:175–184. (In Russ.)
 19. Prikhodko V. A., Povryaeva M. A., Sysoev Yu. I., Shustov E. B., Bulyat A. V. Effects of L-ornithine L-aspartate on the physical performance with experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Biomeditsina = Biomed.* 2020;16(3):77–80. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-16-3-77-80.
 20. Khalil F., Nabil Rafat M., Salah V., Attia M., Ibrahim W. Study of lipid profile in different grades of non-alcoholic fatty liver disease. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2018;73(8):7388–7393.
 21. Trashkov A. P., Brus T. V., Vasil'ev A. G., Artymenko M. R., Pechatnikova V. A., Gumenaja M. A. Biochemical profile of rats with non-alcoholic fatty liver disease of varying severity and its correction with Remaxol. *Pediatr.* 2017;8(4):78–85. (In Russ.) DOI: 10.17816/PED8478-85.
 22. Souza M. R., Diniz M. F., Medeiros-Filho J. E., Araujo M. S. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2012;49(1):89–96. DOI: 10.1590/s0004-28032012000100015.
 23. Adiels M., Taskinen M. R., Packard C., Caslake M. J., Soro-Paavonen A., Westerbacka J., Vehkavaara S., Hakkinen A., Olofsson S. O., Yki-Jarvinen H., Boren J. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia*. 2006;49(4):755–765. DOI: 10.1007/s00125-005-0125-z.
 24. Gaggini M., Morelli M., Buzzigoli E., DeFronzo R. A., Bugianesi E., Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5(5):1544–1560. DOI: 10.3390/nu5051544.
 25. Mahmoud A. A., Elshazly S. M. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One*. 2014;9(9):e106993. DOI: 10.1371/journal.pone.0106993.
 26. Mamikutty N., Thent Z. C., Sapri S. R., Sahrudin N. N., Mohd Y. M. R., Haji S. F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*. 2014;2014:263897. DOI: 10.1155/2014/263897.
 27. D'Amico G., Garcia-Tsao G., Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology*. 2006;44(1):217–231. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.10.013.
 28. Undurti N. D. Beneficial role of bioactive lipids in the pathobiology, prevention, and management of HBV, HCV and alcoholic hepatitis, NAFLD, and liver cirrhosis: A review. *Journal of Advanced Research*. 2019;17:17–29. DOI: 10.1016/j.jare.2018.12.006.
 29. Gyebi L., Soltani Z., Reisin E. Lipid nephrotoxicity: new concept for an old disease. *Current hypertension reports*. 2012;14(2):177–181. DOI: 10.1007/s11906-012-0250-2.
 30. Sackmann-Sala L., Berryman D. E., Munn R. D., Kopchick J. J. Heterogeneity among white adipose tissue depots in male c57bl/6j mice. *Obesity*. 2012;20(1):101–111. DOI: 10.1038/oby.2011.235.
 31. Azimova M. O., Blinova N. V., Zhernakova Ju. V., Chazova I. E. Obesity as a predictor of cardiovascular disease: the role of local fat depots. *Sistemnye Gipertenzii*. 2018;15(3):39–43. (In Russ.) DOI: 10.26442/2075-082X_2018.3.39-43.
 32. Rocha-Rodrigues S., Rodriguez A., Becerril S., Ramirez B., Goncalves I., Beleza J., Fruhbeck G., Ascensao A., Magalhaes J. Physical exercise remodels visceral adipose tissue and mitochondrial lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2017;44(3):386–394. DOI: 10.1111/1440-1681.12706.
 33. Butrova A. S., Dzgoeva F. H. Visceral obesity is a key link in metabolic syndrome. *Ozhirenie i metabolizm*. 2004;1:10–16. (In Russ.)

Влияние клатратного комплекса селенопирана и β -циклогексстрина на скорость заживления условно асептической полнослойной плоскостной раны у крыс

Д. В. Заяц³, О. В. Буюклинская^{2*}, Ю. Р. Федотова⁴, Н. С. Феленко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 163069, Россия, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

³ ЗАО «ФАРМА-СЕВЕР», 164501, Россия, г. Северодвинск, ул. Георгия Седова, д. 4

⁴ ООО «Аквамарин», 163026, Россия, г. Архангельск, ул. Победы, д. 92, кв. 4

*Контактное лицо: Буюклинская Ольга Владимировна. E-mail: obfarm@mail.ru

ORCID: Д. В. Заяц – <https://orcid.org/0000-0002-3908-7217>; О. В. Буюклинская – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>; Ю. Р. Федотова – <https://orcid.org/0000-0002-2549-3679>; Н. С. Феленко – <https://orcid.org/0000-0002-3591-8247>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 10.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Селенопиран – органическое соединение селена, обладающее резко гидрофобными свойствами. Повышение растворимости в воде (как следствие – и биодоступности) возможно за счет образования комплексов включения с циклодекстринами.

Цель. Целью работы явилось изучение влияния геля, содержащего клатратный комплекс селенопирана с β -циклогексстрином, на скорость ранозаживления на модели условно асептической полнослойной плоскостной раны у крыс.

Материалы и методы. Объектом исследования служил гель, содержащий клатратный комплекс селенопирана с β -циклогексстрином (содержание селенопирана в геле – 0,1%). Использовалась модель полнослойной плоскостной раны у половозрелых крыс-самцов. 20 особей разделили на 2 группы – интактную (без лечения) и опытную (получали лечение гелем). Эффективность оценивали по изменению площади раны на 3, 5, 7, 9, 11 и 14 день после нанесения.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что относительная площадь ран у животных с нанесением геля уже к 3 дню эксперимента была меньше, чем у интактных. На пятый день эксперимента различия были статистически значимы ($57,49 \pm 12,51\%$ у животных получающих лечение, по сравнению с $85,27 \pm 26,61\%$ у интактных). К 14 дню эксперимента различия в группах животных практически не наблюдалось.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при использовании геля, содержащего селенопиран в комплексе с β -циклогексстрином, ускоряет переход от фазы воспаления к фазе пролиферации. Вероятнее всего, это связано с антиоксидантными свойствами селенопирана. Учитывая более низкую концентрацию селенопирана в сравнении с терапевтическими концентрациями других антиоксидантов (таурина, аллантоина), его можно рассматривать в качестве перспективного ранозаживляющего средства для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: селенопиран, β -циклогексстрин, гель, рана, заживление раны

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

Вклад авторов. Д. В. Заяц разработал лекарственную форму геля, содержащего клатратный комплекс селенопирана и β -циклогексстрин, производил статистическую обработку данных, участвовал в написании статьи. О. В. Буюклинская, автор идеи по разработке и моделированию экспериментальной модели условно асептической полнослойной плоскостной раны, осуществляла общее руководство исследованием, участвовала в написании статьи. Ю. Р. Федотова проводила оценку кратратного комплекса, содержащего селенопиран и β -циклогексстрин на описанной модели. Н. С. Феленко моделировал условно асептические полнослойные плоскостные раны у экспериментальных животных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта, полученного по результатам конкурса на лучшие проекты молодых ученых по приоритетным направлениям научного и инновационного развития ФГБОУ ВО «СГМУ» Минздрава России.

Для цитирования: Заяц Д. В., Буюклинская О. В., Федотова Ю. Р., Феленко Н. С. Влияние кратратного комплекса селенопирана и β -циклогексстрин на скорость заживления условно асептической полнослойной плоскостной раны у крыс. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4–1):166–170. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-166-170](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-166-170)

Effect of the Clathrate Complex of Selenopyran and β -cyclodextrin on the Rate of Healing of a Conditionally Aseptic Full-thickness Planar Wound in Rats

Daniil V. Zayats³, Olga V. Buyklinskaya^{2*}, Julia R. Fedotova⁴, Nikolay S. Felenko¹

¹ Nothern State Medical University, 51, Troitsky av., Arkhangelsk, 163000, Russia

² Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ "PHARMA-SEVER" CJSC, 4, Georgiia Sedova str., Severodvinsk, 164501, Russia

⁴ "Aquamarin" LLC, 92, app. 4, Pobedy str., Arkhangelsk, 163026, Russia

*Corresponding author: Olga V. Buyklinskaya. E-mail: obfarm@mail.ru

ORCID: Daniil V. Zayats – <https://orcid.org/0000-0002-3908-7217>; Olga V. Buyklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>; Julia R. Fedotova – <https://orcid.org/0000-0002-2549-3679>; Nikolay S. Felenko – <https://orcid.org/0000-0002-3591-8247>.

Received: 20.10.2021

Revised: 10.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Selenopyran is an organic selenium compound with sharply hydrophobic properties. An increase in solubility in water (and as a consequence – and bioavailability) is possible due to the formation of inclusion complexes with cyclodextrins.

Aim. The aim of this work was to study the effect of a gel containing a clathrate complex of selenopyran with β -cyclodextrin on the rate of wound healing on a model of a conditionally aseptic full-thickness planar wound in rats.

Materials and methods. The object of the study was a gel containing a clathrate complex of selenopyran with β -cyclodextrin (the content of selenopyran in the gel was 0.1%). A model of a full-thickness planar wound in sexually mature male rats was used. 20 individuals were divided into 2 groups – intact (without treatment) and experimental (received gel treatment). Efficacy was assessed by the change in wound area at 3, 5, 7, 9, 11 and 14 days after application of wound.

Results and discussion. The results of the study showed that the relative area of the wounds in the treated animals by the 3rd day of the experiment was less than in the intact ones. On the fifth day of the experiment, the differences were statistically significant ($57.49 \pm 12.51\%$ in treated animals versus $85.27 \pm 26.61\%$ in intact animals). By the 14th day of the experiment, there were practically no differences in the groups of animals.

Conclusion. The results obtained indicate that when using a gel containing selenopyran in combination with β -cyclodextrin, it accelerates the transition from the inflammation phase to the proliferation phase. This is most likely due to the antioxidant properties of selenopyran. Considering the lower concentration of selenopyran in comparison with the therapeutic concentrations of other antioxidants (taurine, allantoin), it can be considered as a promising wound healing agent for further study.

Keywords: selenopyran, β -cyclodextrin, gel, wound, 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. Daniil V. Zayats developed a dosage form of a gel containing a clathrate complex of selenopyran and β -cyclodextrin, performed statistical data processing, participated in writing an article. Olga V. Buyklinskaya: the author of the idea for the development and modeling of an experimental model of a conditionally aseptic full-thickness planar wound, carried out the general supervision of the study, and participated in writing the article. Julia R. Fedotova evaluated a clathrate complex containing selenopyran and β -cyclodextrin using the described model. Nikolay S. Felenko simulated conditionally aseptic full-thickness planar wounds in experimental animals. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia. The results of the work were obtained using the equipment of a grant received as a result of a competition for the best projects of young scientists in priority areas of scientific and innovative development of the "Nothern State Medical University".

For citation: Zayats D. V., Buyklinskaya O. V., Fedotova J. R., Felenko N. S. Effect of the clathrate complex of selenopyran and β -cyclodextrin on the rate of healing of a conditionally aseptic full-thickness planar wound in rats. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):166–170. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-166-170](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-166-170)

ВВЕДЕНИЕ

Селенопиран – органическое соединение селена, синтетическое производное селеноксантина. Известно, что указанное соединение проявляет антиоксидантные, иммуномоделирующие, гиполипидемические, антиатеросклеротические, анаболические, радиопротекторные, радиомодифицирующие, адаптогенные и антистрессовые свойства [1–4].

В то же время для данного вещества характерны резко гидрофобные свойства (практически нерастворим в воде), что значительно снижает его биодоступность. Данный показатель можно повысить за счет увеличения растворимости препарата в воде за счет образования комплексов включения с циклодекстринами [5].

Циклодекстрины представляют собой природные макроциклы углеводной природы, несущие в составе молекулы цилиндрическую полость. Форма молекул циклодекстринов представляет собой усеченный конус. Данная форма стабилизирована водородными связями между ОН-группами. Все ОН-группы в циклодекстринах находятся на внешней поверхности молекулы, поэтому внутренняя полость циклодекстринов является гидрофобной. Это позволяет включать в молекулу циклодекстрина лекарственные препараты, обладающие гидрофобными свойствами [6]. За счет образования клатратного комплекса изменяются свойства гидрофобных лекарственных веществ, в частности, повышается их растворимость в воде и стабильность, а также меняются технологические свойства [7]. Возможность применения цик-

лодекстринов в наружных лекарственных формах в качестве энхансеров (веществ, увеличивающих проникновение лекарственных веществ) в последние годы активно изучается. Их достоинством является то, что данные соединения терапевтически инертны, не мешают нормальному функционированию кожи, не меняют pH, не вызывают раздражения [8]

Целью работы явилось изучение влияния геля, содержащего клатратный комплекс селенопирана с β -цикло-декстрином, на скорость ранозаживления на модели условно асептической полнослойной плоскостной раны у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил гель, содержащий клатратный комплекс селенопирана с β -цикло-декстрином (1:10). Лекарственная форма геля является удобной для нанесения на раневую поверхность, не растекается, активные компоненты иммобилизированы в гелевой форме. Состав геля представлен в таблице 1.

Таблица 1. Состав исследуемого геля

Table 1. Composition of testing gel

Компонент лекарственной формы Component of drug form	Содержание, г Containing, g
Клатратный комплекс селенопирана с β -цикло-декстрином (1:10) Clathrate complex of selenopyran with β -cyclodextrin (1:10)	0,5
Карбопол Carbopol	0,5
Нипагин: нипазол (3:1), г Nipagin: nipazole (3:1), g	0,1
0,1 М раствор натрия гидроксида 0,1 M sodium hydroxide solution	5,0
Вода очищенная Purified water	до 50,0

Таким образом, гель содержит в своем составе 0,1 % селенопирана.

Для определения ранозаживляющей активности геля использовали модель условно асептической полнослойной плоскостной раны у крыс [9]. Для проведения исследования использовали здоровых, полновозрелых крыс мужского пола, весом 200 ± 20 г. Для воспроизведения модели полнослойной плоскостной кожной раны у крыс под эфирным наркозом выстригали шерсть и подшерсток в области середины спины и вырезали кожный лоскут площадью около 100 mm^2 , удаляя также подкожную жировую клетчатку. Дефекты кожи оставляли открытыми на протяжении всего периода наблюдений. В эксперименте было задействовано 20 особей, которые разделили на 2 группы по 10 животных:

- группа I – интактная, плоскостные раны животных не подвергались воздействию каких-либо лекарственных препаратов;

- группа II – животным в день нанесения раны и далее ежедневно 1 раз в сутки на рану тонким слоем наносили 0,2–0,3 грамма исследуемого геля.

Скорость закрытия ран оценивали с помощью планиметрического метода Л. Н. Поповой [10]. Измерение площади раневой поверхности осуществляли сразу после нанесения раны, а также на 3, 5, 7, 9, 11 и 14 сутки после моделирования плоскостной раны. На кожный дефект накладывали предметное стекло и обводили контур раны маркером. Стёкла сканировали на сканере EpsonStylus CX8300. Площадь раны определяли с помощью программного комплекса «ImageJ» для обработки изображений. Вычисляли относительную площадь ран (ОПР), по формуле:

$$\text{ОПР} = \left(\frac{S}{S_0} \right) \cdot 100 \%,$$

где S – площадь раны при наблюдении (мм^2); S_0 – исходная площадь раны (мм^2).

На 14 день после моделирования полнослойной плоскостной раны животным проводилась эвтаназия путем передозировки средств для наркоза с учетом положений, регламентируемых Правилами гуманного обращения с лабораторными животными.

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета прикладных программ STATA («StataCorp»). Определялись следующие показатели: средняя арифметическая (M), среднее квадратичное отклонение (p), ошибка средней арифметической (m). Для оценки статистической значимости полученных различий использовался непараметрический критерий Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика изменения относительных площадей условно асептических полнослойных плоскостных ран представлена в таблице 2 и на рисунке 1.

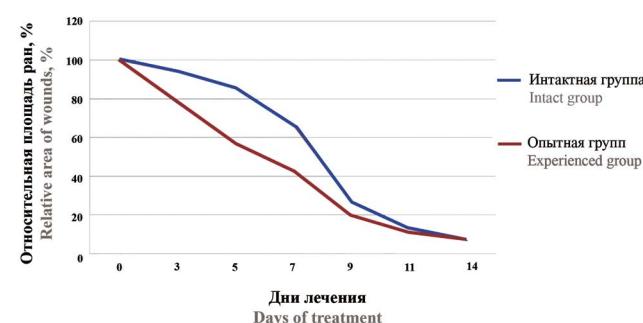


Рисунок 1. Влияние геля, содержащего клатратный комплекс селенопирана, на относительную площадь полнослойной плоскостной раны у крыс

Figure 1. The effect of a gel containing a selenopyran clathrate complex on full-thickness planar wound relative area in rats

Таблица 2. Динамика изменения относительных площадей условно асептических полнослойных плоскостных ран у крыс

Table 2. Dynamics of change in relative areas conditionally aseptic full-thickness planar wounds in rats

День эксперимента Day of experiment	Группа I (интактная) Group I (Intact)	Группа II (нанесение на раневую поверхность 0,1 % геля 1 раз в сутки) Group II (application of 0.1 % gel to the wound surface once a day)
1	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
3	93,78 ± 26,01	78,11 ± 17,45
5	85,27 ± 26,61	57,49 ± 12,51*
7	66,37 ± 22,98	43,13 ± 17,69
9	26,85 ± 13,29	20,07 ± 11,38
11	12,59 ± 8,62	11,45 ± 5,80
14	7,10 ± 2,98	6,90 ± 5,32

Примечание. * Имеется статистически значимое отличие в группе животных с применением клатратного комплекса селенопирана и циклодекстрина, относительно интактной группы животных при $p < 0,05$.

Note. * Statistically significant difference in the group of animals using the clathrate complex of selenospiran and cyclodextrin vs intact group, $p < 0.05$.

Результаты исследования показали, что к 3-му дню эксперимента заживление полнослойной плоскостной раны протекало более интенсивно у животных, получавших 0,1 % гель, содержащий клатратный комплекс селенопирана и циклодекстрина, по сравнению с показателями группы интактных животных (см. таблицу 2). На 5-й день эксперимента применение клатратного комплекса способствовало сокращению относительной площади раны до $57,49 \pm 12,51\%$ по сравнению $85,27 \pm 26,61\%$ в интактной группе, различие признано достоверным (статистически значимым). С 7-го по 14-й день после моделирования полнослойной плоскостной раны наблюдалось постепенное снижение различий относительной площади ран между параметрами в группе животных, получавших селенопиран в комплексе с циклодекстрином, и интактной группой: 7-й день – на 23,24 %, 9-й день – на 6,78 %, 11-й день – на 1,14 %, 14-й день – на 0,3 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что клатратный комплекс селенопирана и β -циклодекстрина в лекарственной форме 0,1 % геля сокращал сроки заживления на модели условно асептической плоскостной полнослойной раны у крыс. При применении селенопирана, различия в относительной площади раны начинают наблюдаться уже к 3 суткам эксперимента. Скорость уменьшения относительной площади раны в период с 1 по 5 сутки у животных, получающих селенопиран, составила в среднем 10,63 % в сутки и была максимальной за весь период экспе-

римента, в то время как у интактных животных в этот же период она составляла всего 3,68 % в сутки. Максимальная скорость уменьшения площади раны у интактных животных наблюдалась позже – с 5 по 9 сутки эксперимента в среднем 14,61 % в сутки. Таким образом, нанесение 0,1 % геля селенопирана на условно асептические полнослойные плоскостные раны у крыс ускоряло наступление фазы пролиферации, при которой происходит быстрое закрытие раны, по сравнению с интактными животными.

Механизм данного эффекта может быть связан с антиоксидантной активностью селенопирана. Как известно, свободнорадикальные реакции оказывают значительное влияние на протекание раневого процесса. В условиях исчерпания ресурсов собственной антиоксидантной системы в области раны запускается каскад вторичных свободнорадикальных реакций как непосредственно в ране, так и в клетках перифокальной зоны. В результате развитие последующих фаз раневого процесса после воспаление задерживается [11]. Селенопиран, обладающий антиоксидантными свойствами, подавляет вторичные свободнорадикальные реакции, вследствие чего ускоряется переход от фазы воспаления к фазе пролиферации. При этом значительно снижается риск развития хронического воспаления, которое может привести к появлению длительно незаживающей раны.

Лекарственные формы, включающие другие антиоксиданты, например, таурин и аллантоин применяются в более высоких концентрациях: 4–0,5 % [12]. В то же время концентрация селенопирана в составе разработанного нами геля значительно ниже, чем у перечисленных выше средств. В связи с этим селенопиран можно рассматривать в качестве перспективного ранозаживляющего средства, требующего дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Галочкин В. А., Галочкина В. П. Органические и минеральные формы селена, их метаболизм, биологическая доступность и роль в организме. Сельскохозяйственная биология. 2011;(4):3–15.
- Heinrich L. A., Pajaziti B., Roziev R. Drug delivery system of a radio-protective inclusion complex. *Advanced Materials Research*. 2014;(872):231–236. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.872.231.
- Измельцева О. С. Еримбетов К. Т., Бондаренко Е. В., Гончарова А. Я., Жаворонков Л. П., Иванов В. Л., Чибисова О. Ф. Экспериментальная оценка адьювантных свойств 9-фенил-симвимоктагидроселено-кстантена при радиотерапии. Радиационная биология. Радиоэкология. 2017;(4):391–398. DOI: 10.7868/S0869803117040051.
- Никулина А. В., Середа Н. В. Научное обоснование назначения молодняку продуктивных животных биоактивных добавок в условиях селенодефицитного региона. Вестник Оренбургского государственного университета. 2016;(10):69–73.
- Беккер Г. В., Куксон В. Ю., Штырькова В. В. Увеличение водорастворимости препарата «Галодиф» при помощи создания комплексов включения с бета-циклодекстрином. Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых

- ученых имени выдающихся химиков Л. П. Кулёва и Н. М. Кижнера, посвященной 110-летию со дня рождения профессора А. Г Стромberга. 21–24 сентября 2020; Томск: Томский политехнический университет; 2020. С. 302–303.
6. Капустин М. А., Гавриленко Н. В., Курченко В. П. Получение и свойства комплексов включения циклодекстрина с диметилющим эфиром фталевой кислоты. *Труды БГУ*. 2011;(6):126–133.
 7. Савельева Е. И. Современные технологии модифицированного высвобождения биологически активных веществ в фармацевтической разработке. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;(2):56–66. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-56-66.
 8. Кедик С. А., Панов А. В., Тюкова В. С., Золотарева М. С. Циклодекстрины и их применение в фармацевтической промышленности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):68–75.
 9. Миронов А. И. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
 10. Грабарская Е. А., Данилевская Н. В., Дельцов А. А. Изучение ранозаживляющей активности новой многокомпонентной мази. *Российский ветеринарный журнал*. 2015;(3):48–50.
 11. Морозов А. М., Сергеев А. Н., Сергеев Н. А., Дубатолов Г. А., Рыжова Т. С., Пахомов М. А., Пельтихина О. В. Современные методы стимуляции процесса регенерации послеоперационных ран. *Сибирское медицинское обозрение*. 2020;(3):54–60. DOI: 10.20333/2500136-2020-3-54-60.
 12. Тупкин В. Ф., Сливкин А. И., Поворотова С. И., Федосов П. А., Беленова А. С., Веретенникова М. А. Ранозаживляющий гель для наружного применения. Патент РФ на изобретение № 2611400. 23.04.2015. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2611400C2/ru>. Ссылка активна на 09.11.2021.
 7. Savelyeva E. I. Modern technologies of controlled release of biologically active substances in pharmaceutical research and development: A Review. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;(2):56–66. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-56-66.
 8. Kedik S. A., Panov A. V., Tyukova V. S., Zolotareva M. S. Cyclodextrins and their application in pharmaceutical industry A Review. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;(3):68–75. (In Russ.)
 9. Mironov A. I. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. [Guidelines for Conducting Preclinical Trials of Medicines]. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
 10. Grabarskaya E. A., Danilevskaya N. V., Deltsov A. A. Study of the wound healing activity of a new multicomponent ointment. *Rossiyskiy veterinarniy zhurnal = Russian veterinary journal*. 2015;(3):48–50. (In Russ.)
 11. Morozov A. M., Sergeev A. N., Sergeev N. A., Dubatlov G. A., Ryzhova T. S., Pahomov M. A., Peltihina O. V. Modern methods of stimulating the process of regeneration of postoperative wounds. *Sibirskoe meditsinskoе obozrenie = Siberian Medical Review*. 2020;(3):54–60. (In Russ.) DOI: 10.20333/2500136-2020-3-54-60.
 12. Tupkin V. F., Slivkin A. I., Povorotova S. I., Fedosov P. A., Veretennikova M. A. *Ranozazhivljajushhij gel' dlya naruzhnogo primenenija* [Wound healing gel for external using]. Patent RUS № 2611400. 23.04.2015. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2611400C2/ru>. Accessed: 09.11.2021. (In Russ.)

REFERENCES

1. Galochkin V. A., Galochkina V. P. Organic and mineral forms of selenium, their metabolism, bioavailability and role in the body. *Selskohozaystvennaya biologia = Agricultural Biology*. 2011;(4):3–15. (In Russ.)
2. Heinrich L. A., Pajaziti B., Roziev R. Drug delivery system of a radio-protective inclusion complex. *Advanced Materials Research*. 2014;(872):231–236. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.872.231.
3. Izmestiyeva O. S., Erimbetov K. T., Bondarenko E. V., Goncharova A. Ya., Zhavoronkov L. P., Ivanov V. L., Chibisova O. F. Experimental evaluation of the adjuvant properties of 9-phenyl-sym-octahydroseleno-xstanten in radiotherapy. *Radiatsionnaya biologia. Radioecologiya = Radiation biology. Radioecology*. 2017;(4):391–398. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0869803117040051.
4. Nikulina A. V., Sereda N. V. Scientific substantiation of the appointment of young productive animals of bioactive additives in a selenium-deficient region. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2016;(10):69–73. (In Russ.)
5. Bekker G. V., Kuksyonomok V. Yu., Shtrykova V. V. *Uvelichenie vodrastvorimosti preparata «Galodif» pri pomoshchi sozdaniya kompleksov vkljuchenija s beta-ciklodekstrinom. Himija i himicheskaja tehnologija v XXI veke: materialy XXI Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii studentov i molodyh uchenyh imeni vydajushhihsja himikov L. P. Kuljova i N. M. Kizhnера, posvjashchennoj 110-letiju so dnja rozhdenija professora A. G Stromberga* [Increasing the water solubility of the "Galodif" preparation by creating inclusion complexes with beta-cyclodextrin. Chemistry and chemical technology in the XXI century: materials of the XXI International scientific-practical conference of students and young scientists named after outstanding chemists L. P. Kulev and N. M. Kizhner, dedicated to the 110th anniversary of the birth of Professor A. G. Stromberg]. September 21–24, 2020; Tomsk: Tomsk Polytechnic University; 2020. P. 302–303. (In Russ.)
6. Kapustin M. A., Gavrilenco N. V., Kurchenko V. P. Preparation and properties of inclusion complexes of cyclodextrin with phthalic acid dimethyl ester. *Trudy BGU = Proceedings of the Belarusian State University*. 2011;(6):126–133. (In Russ.)



Сравнительная эффективность трансдермальных форм для терапии алопеции

У. В. Ногаева^{1*}, Д. Ю. Ивкин¹, Г. А. Плиско¹, Е. В. Флисюк¹, В. Е. Ковансков¹,
Ю. Г. Штырлин², К. О. Сидоров¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

*Контактное лицо: Ногаева Ульяна Валерьевна. E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: У. В. Ногаева – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Г. А. Плиско – <https://orcid.org/0000-0003-0869-3430>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; В. Е. Ковансков – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>; Ю. Г. Штырлин – <https://orcid.org/0000-0002-2777-719X>;
К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 10.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Алопеция – полиэтиологическое заболевание, при котором наблюдается повышенное выпадение волос и уменьшение их количества на единицу площади. Обслысение доставляет пациентам психологический и социальный дискомфорт, в связи с чем важной задачей является разработка составов, по своей эффективности превосходящих эталонные средства.

Цель. Изучение возможности применения оригинальной субстанции У в нескольких ЛФ для терапии алопеции в сравнении с референс-препаратами: миноксидилом и репейным маслом.

Материалы и методы. Объектом исследования стала оригинальная субстанция У, для которой было изготовлено несколько лекарственных форм: гель, спиртовой и масляные составы. Исследование эффективности и безопасности разработанных препаратов проведено на 9 группах мышей-самцов линии C57BL/6. Депиляция с дальнейшей оценкой процентного соотношения волоссянных фолликулов в фазах роста и покоя апробирована в качестве доклинической модели алопеции. При изучении механизма действия вещества У проводился хемилюминесцентный анализ по сравнению с природным антиоксидантном кверцетином в системе люминол – 2,2'-азобис(2-амидинопропана)дигидрохлорид, в среде калий-фосфатного буфера (pH = 7,4). Статистическая обработка результатов проведена с помощью двухфакторного дисперсионного анализа посредством программы GraphPad Prism 8.0.2, США при уровне статистической значимости различий $p < 0,05$ и $p < 0,005$.

Результаты и обсуждение. На основе результатов гистологического анализа и визуальных изменений установлено, что эффективность топических форм вещества У убывает в ряду: гель, спиртовая форма, масляный состав. Использование комбинации гелевой основы с испытуемым веществом У привело к появлению большего количества волоссянных фолликулов в фазе роста, чем при нанесении референтного препарата – 2 % раствора миноксида (различия статистически значимы). Хемилюминесцентная оценка антиоксидантной активности показала отсутствие антиоксидантного действия у вещества У.

Заключение. Исследование объединяет два фармацевтических профиля: технологический и фармакологический. В ходе проведённых экспериментов показана перспективность гелевой формы оригинального вещества У для топической терапии алопеции. В ближайшее время планируется изучение механизма действия вещества У, а также оформление патентной защиты нового ЛП.

Ключевые слова: алопеция, миноксидил, доклинические исследования, трансдермальные лекарственные формы, волоссяной фолликул

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

Вклад авторов. Ю. Г. Штырлин синтезировал субстанцию У. Е. В. Флисюк и У. В. Ногаева разработали составы и изготовили топические лекарственные формы. Д. Ю. Ивкин, У. В. Ногаева, Г. А. Плиско провели доклинические исследования эффективности и безопасности полученных составов, а также хемилюминесцентную оценку антиоксидантной активности. У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, В. Е. Ковансков и К. О. Сидоров участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Ногаева У. В., Ивкин Д. Ю., Плиско Г. А., Флисюк Е. В., Ковансков В. Е., Штырлин Ю. Г., Сидоров К. О. Сравнительная эффективность трансдермальных форм для терапии алопеции. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4-1):171-178. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-171-178](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-171-178)

Comparative Efficacy of Transdermal Forms for Alopecia Therapy

Uljana V. Nogaeva^{1*}, Dmitry Yu. Ivkin¹, Grigorij A. Plisko¹, Elena V. Flisyuk¹,
Vladislav E. Kovanskov¹, Yuri G. Shtyrlin², Kirill O. Sidorov¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, 18, Kremlevskaya str., Kazan, 420008, Russia

*Corresponding author: Uljana V. Nogaeva. E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: Uljana V. Nogaeva – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Grigorij A. Plisko – <https://orcid.org/0000-0003-0869-3430>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Vladislav E. Kovanskov – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>; Yuri G. Shtyrlin – <https://orcid.org/0000-0002-2777-719X>;
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Received: 20.10.2021

Revised: 10.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Alopecia is a polyetiological disorder characterized by hair loss and reducing their number per unit area. Baldness causes psychological and social discomfort to patients, in connection with what an important task is to develop formulations that are more effective than the reference agents.

Aim. Investigate the possibility of applying the original substance Y in several dosage forms for the treatment of alopecia in comparison with reference drugs: minoxidil and burdock oil.

Materials and methods. The research subject was the original substance Y, for which several dosage forms were made: gel, alcohol and oil compositions. The study on the effectiveness and safety of the developed formulations was carried out on 9 groups of male C57BL/6 mice. Depilation with further assessment of the percentage of hair follicles in the growth and resting phases was tested as a pre-clinical model of alopecia. In the study of the mechanism of action of substance Y, chemiluminescent assay was performed compared with natural antioxidant quercetin in the system luminol – 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)dihydrochloride, in potassium-phosphate buffer medium (pH = 7.4). Statistical processing of the results was carried out using two-way ANOVA using GraphPad Prism 8.0.2, USA software at the level of statistical significance of differences $p < 0.05$ and $p < 0.005$.

Results and discussion. Based on the results of histological analysis and visual changes, it was found that the effectiveness of the topical forms of substance Y decreases in the following order: gel, alcohol form, oil composition. The use of a combination of the gel base with the test substance Y resulted to the appearance of a larger number of hair follicles in the growth phase than when using the reference preparation – 2 % minoxidil solution (the differences are statistically significant). Chemiluminescent assessment of antioxidant activity showed the lack of antioxidant effect in substance Y.

Conclusion. The study combines two pharmaceutical profiles: technological and pharmacological. In the course of the experiments, the prospects of the gel form of the original substance Y for topical therapy of alopecia were shown. In the near future, it is planned to study the mechanism of action of substance Y, as well as registration of patent protection for a new drug.

Keywords: alopecia, minoxidil, preclinical studies, transdermal dosage forms, hair follicle

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. Yuri G. Shtyrlin synthesized substance Y. Elena V. Flisyuk and Uljana V. Nogaeva developed formulations and manufactured topical dosage forms. Dmitry Yu. Ivkin, Uljana V. Nogaeva, Grigorij A. Plisko conducted preclinical studies of the efficacy and safety of the formulations obtained, as well as chemiluminescent assay of antioxidant activity. Uljana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Vladislav E. Kovanskov, Kirill O. Sidorov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Nogaeva U. V., Ivkin D. Yu., Plisko G. A., Flisyuk E. V., Kovanskov V. E., Shtyrlin Yu. G., Sidorov K. O. Comparative efficacy of transdermal forms for alopecia therapy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):171–178. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-171-178](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-171-178)

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания волос представляют собой значимую медико-социальную проблему, связанную с их широкой распространенностью и серьезным влиянием на качество жизни человека [1, 2].

По статистике около 50 % населения в той или иной степени сталкиваются с алопецией. Патология проявляется повышенным выпадением волос и уменьшением их плотности на единицу площади. В норме человек ежедневно может терять до 100 волос, потеря большего количества уже является признаком заболевания и требует особого внимания.

Анализ современного ассортимента лекарственных препаратов (ЛП) для терапии алопеции приводит к выводу о необходимости поиска и разработки новых активных фармацевтических субстанций (АФС) [3, 4].

Поскольку терапевтическая эффективность АФС во многом определяется лекарственной формой (ЛФ), **целью работы** стало изучение возможности применения оригинальной субстанции У в несколь-

ких ЛФ для терапии алопеции в сравнении с референт-препаратами.

Во время работы решались следующие задачи:

1. Разработка состава и изготовление топических ЛФ испытуемого вещества.
2. Сравнение фармакологической активности вещества У в различных ЛФ.
3. Сравнение эффективности исследуемой субстанции У и референтных препаратов: 2 % раствора миноксицила и репейного масла по влиянию на рост волос на доклинической модели алопеции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стало вещество У, являющееся по своей химической природе азотсодержащим органическим соединением. В ходе хронического токсического эксперимента на 13 самцах и самках кроликов породы советская шиншилла была обнаружена способность испытуемой субстанции стимулировать рост волос.

Базируясь на данных анализа рынка препаратов для терапии алопеции, было решено изучить компонент У в форме геля на основе гидроксипропилметилцеллюлозы, спиртового и масляного растворов. Концентрация действующего вещества во всех ЛФ составила 1 %. При изготовлении составов использовали весы OHAUS PA-214, США и мешалку с верхним приводом Heidolph RZR 2000, Германия.

В качестве референтных препаратов животным наносили 2 % спиртовой раствор миноксицила (Генералон®, спрей для наружного применения 60 мл, производства БЕЛУПО, Хорватия, серия Р123, срок годности до 07.2022) и репейное масло (Репейное масло, 100 мл, ООО «Эльфарма.ру», Россия, срок годности до 04.2023).

Депиляция животных с последующей оценкой состояния и процентного соотношения волосяных луковиц (ВЛ) в стадии роста (анагена) и покоя была выбрана в качестве доклинической модели алопеции [5]. Основной эксперимент был проведен на мышах-самцах линии C57BL/6 с начальной средней массой тела 14–16 г. Методом рандомизации животных разделили на 9 групп по 8 мышей. Количество животных, используемое в исследовании, было достаточным для получения статистически достоверных результатов, и при этом минимальным по биоэтическим принципам. В первый день исследования каждому животному по трафарету на дорсальной части спины выбирали участок шерсти размером 2 × 2 см. В течение последующих 28 дней мышам накожно наносили испытуемые ЛП.

По истечению времени эксперимента животных подвергали эвтаназии в СО₂-боксе (установка для эвтаназии BIOSCAPE ИД № БЭ/01/ЦЭФ; время программы: 720 секунд) и со спины брали участки кожи для гистологического анализа.

В качестве статистической обработки результатов исследования выполняли расчёт элементарных статистик: средние значения и стандартные ошибки среднего ($M \pm m$). Для оценки статистических различий применяли двухфакторный дисперсионный анализ, при котором рассматривали влияние ЛП на соотношение количества волосяных фолликулов (ВФ), находящихся в фазах роста и покоя с помощью программы GraphPad Prism 8.0.2, США при уровнях статистической значимости различий $p < 0,05$ и $p < 0,005$.

Фармакологический эффект некоторых средств, в том числе, способность стимулировать рост волос, обусловлен их антиоксидантными свойствами [6, 7], поэтому стоило выяснить, обладает ли такой активностью вещество У.

Исследование общей антиоксидантной активности исследуемых образцов проводили в системе люминол – 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана)дигидрохлорид, в среде калий-фосфатного буфера (рН = 7,4) на хемилюминометре Lum-5773 (ООО «ДИСофт», Россия) при поддержке ПО PowerGraph 3.3. Природный антиоксидант – кверцетин был взят в качестве контроля.

В кювету помещали 465 мкл калий-фосфатно-буферного раствора, 10 мкл раствора люминола, 60 мкл рабочего раствора экстракта, перемешивали. В течение пяти минут инкубировали при температуре 37 °C, после чего добавляли 60 мкл рабочего раствора 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана). Регистрировали интенсивность хемилюминесценции до середины пика кривой. Параллельно снимали показания контрольного опыта. Повторности замера – 2 раза в идентичных условиях.

Латентный период (ЛП) определяли по формуле:

$$\text{ЛП} = t \text{ до вершины пика}$$

$$c a/o - t \text{ до вершины пика без } a/o.$$

Процент ингибирования хемилюминесценции (ПИХ) определяли по формуле:

$$\text{ПИХ} = \frac{S_{\text{пика без } a/o} - S_{\text{пика } a/o}}{S_{\text{пика без } a/o}} \cdot 100.$$

Расчет общей антиоксидантной активности (ОАА) проводился по формуле:

$$\text{ОАА} = \frac{(\text{ЛП}_{\text{экстр.}} \cdot C_{\text{кверц.}} \cdot M_{\text{кверц.}} \cdot 1000)}{\text{ПИХ}_{\text{кверц.}} \cdot C_{\text{экстр.}}},$$

$$\text{ОАА ПИХ} = \frac{(\text{ПИХ}_{\text{экстр.}} \cdot C_{\text{кверц.}} \cdot M_{\text{кверц.}} \cdot 1000)}{\text{ПИХ}_{\text{кверц.}} \cdot C_{\text{экстр.}}},$$

где $C_{\text{кверц.}}$ и $C_{\text{экстр.}}$ – концентрация кверцетина и экстракта соответственно, моль/л; $M_{\text{кверц.}}$ – молярная масса кверцетина, г/моль; ПИХ_{кверц.} и ПИХ_{экстр.} – процент ингибирования хемилюминесценции кверцетина и экстракта соответственно, %; ЛП_{кверц.} и ЛП_{экстр.} – латентный период кверцетина и экстракта соответственно, с.

Значение ОАА определяли в единицах действия (ЕД) кверцетина, как природного антиоксиданта. ОАА показывает, сколько мг кверцетина соответствует 1 г. исследуемого экстракта по антиоксидантной активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

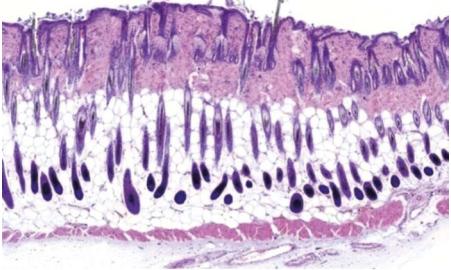
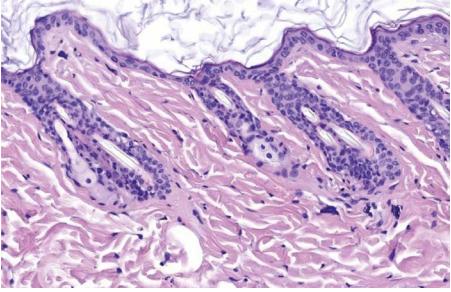
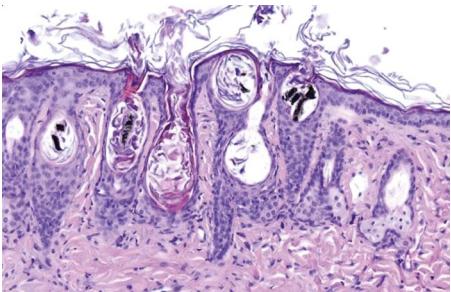
Выбранная нами доклиническая модель – депиляция с дальнейшей оценкой состояния ВФ, была ранее апробирована рядом авторов [8, 9]. При изучении микроскопии срезов кожных лоскутов можно увидеть особенности, обусловленные фазой развития волоса (таблица 1).

Использование фотофиксации позволило наблюдать динамику происходящих изменений и сравнивать визуальный эффект, оказываемый применяемыми препаратами (рисунок 1).

Длительный опыт применения миноксицила и результаты клинических исследований подтверждают целесообразность применения его наружных форм в лечении алопеции [10]. Способность миноксицила препятствовать развитию алопеции доказана и активно используется трихологами на практике.

Таблица 1. Гистологическая характеристика стадий развития волоса

Table 1. Histological characteristics of the stages of hair development

Фаза Phase	Фото Photo
Рост (анаген) Growth (anagen)	
Описание. Корни волос погружены глубоко в подкожную жировую клетчатку. Стержни и корни волос значительно утолщены	
Description. The hair roots are buried deep in the subcutaneous fatty tissue. Hair shafts and roots are significantly thickened	
Покой (тэлоген) Rest (telogen)	
Описание. Волосяной фолликул укорочен. Признаков пролиферации эпителиального влагалища волоса нет, стержень волоса тонкий, также без признаков пролиферации его элементов, минимальное количество меланоцитов	
Description. Hair follicle is shortened. There are no signs of proliferation of the epithelial sheath of the hair, the hair shaft is thin, also without signs of proliferation of its elements, the minimum number of melanocytes	
Отмирание (катаген) Withering away (catagen)	
Описание. Волосяные фолликулы находятся в поверхностных отделах дермы, наблюдается формирование «колбы волоса», признаков пролиферации элементов корня и стержня нет	
Description. Hair follicles are located in the superficial parts of the dermis, the formation of a «hair bulb» is observed, there are no signs of proliferation of the elements of the root and shaft.	

При использовании миноксицила на выбритом участке дорсальной части спины мышей линии C57BL/6, наблюдалось значимое увеличение количества волоссяных фолликулов в фазе роста. При этом через полторы-две недели после начала терапии было заметно усиление выпадения волос (период синхронизации).

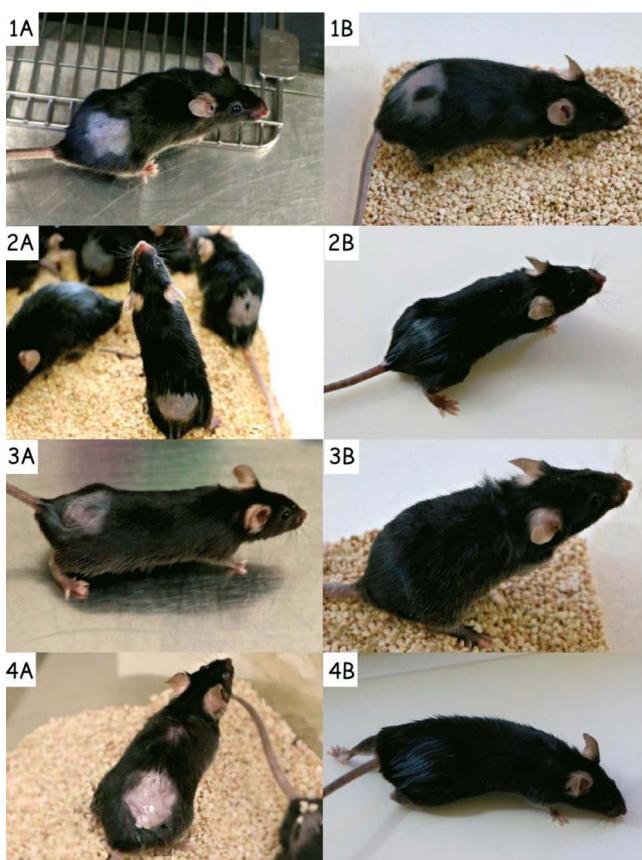


Рисунок 1. Визуальные изменения состояния волосяного покрова.

Примечания. А – 1-й день эксперимента; В – 28-й день эксперимента. 1 – контрольная группа (изотонический раствор хлорида натрия); 2 – референтная группа (репейное масло); 3 – референтная группа (2 % раствор миноксицила); 4 – испытуемое средство (гелевая основа + У)

Figure 1. Visual changes in the state of the hairline.

Notes. A – 1 day of the experiment; B – 28 day of the experiment. 1 – control group (isotonic sodium chloride solution); 2 – reference group (burdock oil); 3 – reference group (2 % minoxidil solution); 4 – test agent (gel base + Y)

Эта же особенность фармакодинамики миноксицила отмечается у ряда авторов [11].

При анализе состава референтного препарата Генералон® было выявлено, что вспомогательными веществами являются 96 % спирт этиловый, пропиленгликоль и вода. Такое сочетание представляет собой растворитель для широкого круга веществ, однако его влияние на рост волос мало изучено. Поэтому в лабораторных условиях приготовили основу состава: этанол 6 мл, пропиленгликоль 2 мл, вода очищенная до 10 мл и наносили ее животным на выбритый участок спины.

Результаты гистологического исследования свидетельствовали о том, что топическое применение основы на тест-системе в течение 28 дней привело к двукратному уменьшению числа ВЛ в фазе роста по сравнению с миноксицилом: $11,2 \pm 2,31\%$ и $22,13 \pm 2,57\%$, соответственно. Вероятно, такой ре-

зультат связан с подсушивающим действием спирта, которое стимулирует усиление выработки кожного сала и закупоривание пор. Похожие наблюдения отмечались в исследовании, проведённом в Корее, где на десятый день эксперимента у группы, получавшей 50 % этиловый спирт, плотность ВФ была значительно ниже, чем у животных, которым наносили 3 % миноксидил [12].

Включение испытуемого вещества У в состав спиртовой основы привело к переходу $61,00 \pm 3,03$ % ВФ в стадию роста, что практически в 5,45 раз превышает данные группы, получавшей чистую спиртовую основу, значения статистически значимы. По сравнению с животными, которым наносили миноксидил, у мышей, получавших основу с компонентом У, количество ВФ в фазе роста было в три раза больше. При попытке объяснить этот феномен возникает несколько гипотез:

1. Результат может быть связан с большей клинической эффективностью вещества У по сравнению с миноксидилом.
2. Для эксперимента была взята 2 % концентрация миноксидила, менее эффективная, чем 5 %, рекомендованная Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) при лечении андрогенетической алопеции у мужчин.
3. Связь с недостаточной продолжительностью терапии, поскольку известно, что максимальный эффект миноксидила развивается через 5–6 недель постоянного нанесения [13].

С целью применения масляных составов для наружной терапии алопеции, была изготовлена эмульсионная основа, состоящая из 8,5 частей миндального масла, 0,5 частей масла чайного дерева и 1 части изопропилового спирта, как растворителя АФС и пенетранта [14].

Согласно проведенным исследованиям, препарат сравнения – репейное масло оказался клинически лучше масляной основы и наглядно подтвердил свой фармакологический эффект. При нанесении масляной основы + У наблюдался результат, сопоставимый с действием репейного масла – $52,33 \pm 19,01$ % ВЛ в анагене. Чистая масляная основа привела к появлению только $10,29 \pm 6,75$ % ВФ в фазе роста, вероятно, из-за нарушения питания волоса и забивания пор.

В литературе описаны данные, свидетельствующие о том, что использование гелей при алопеции позволяет увеличить время экспозиции и эффективность терапии [15, 16].

На базе GMP тренинг-центра СПХФУ была разработана гелевая основа, содержащая в своем составе компонент У. Оказалось, что полученная форма обладает наивысшей эффективностью среди изученных ЛП: $70,25 \pm 1,45$ ВФ в стадии роста. При этом гелевая основа без АФС также способствовала развитию положительной динамики – $52,67 \pm 12,77$ % ВЛ. Оба геля по стимулированию перехода ВФ из стадии покоя в фазу роста превзошли референс-препараты.

Результаты статистической обработки представлены на рисунке 2.

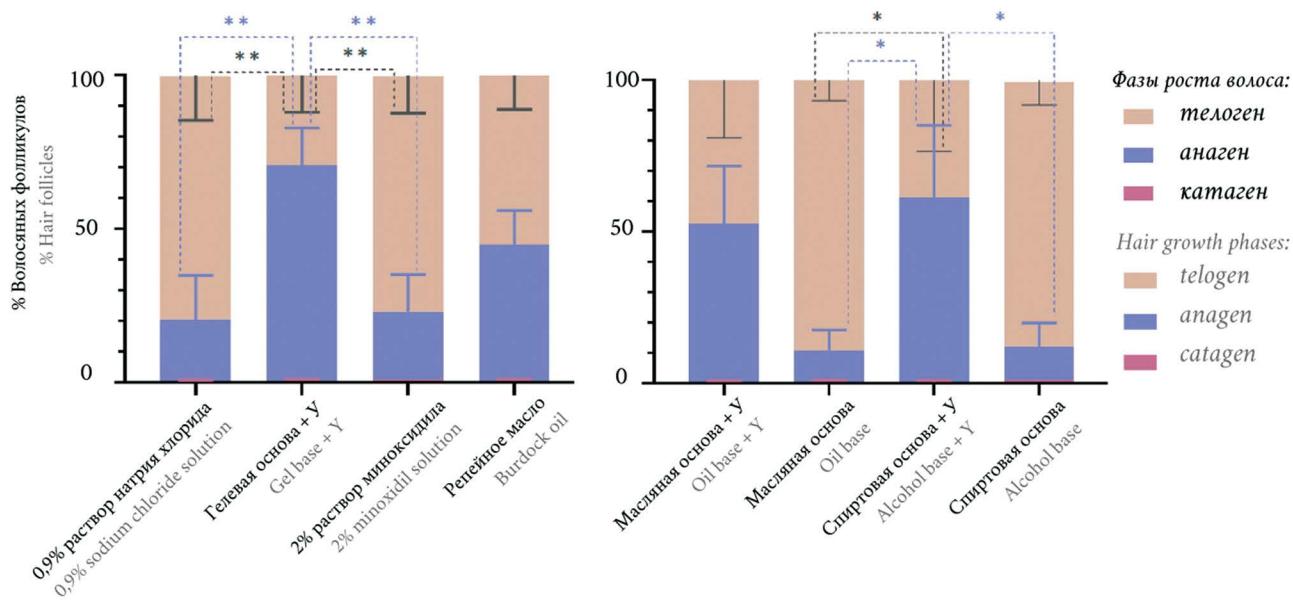


Рисунок 2. Статистические различия между исследуемыми и контрольными группами

Figure 2. Statistical differences between study and control groups

Делая обобщение по проведённым экспериментам, можно сказать о терапевтической эффективности субстанции У для терапии алопеции.

Степень влияния испытуемых форм с веществом У на переход ВФ в фазу роста уменьшается в ряду: гелевая основа + У, спиртовая основа + У, масляная основа + У. Хотя визуально волосы росли с разной скоростью, к концу эксперимента волосяной покров у всех животных приобрёл первоначальный вид. Эти данные могут быть обусловлены биофармацевтическими аспектами используемых лекарственных форм. На рисунке 3 представлена зависимость числа ВФ в фазе роста от используемого препарата на 29-й день эксперимента.

Обращаясь к клиническому применению, важно сказать об особенностях нанесения разработанных ЛП. Гель требует втирания в кожу головы, он гидрофильный и не оставляет жирных следов. Спиртовой раствор следует распылять, а форму на масляной основе после некоторого периода экспозиции необходимо смыть.

Хемилилюминесцентная оценка антиоксидантной активности, как одного из возможных механизмов действия, показала, что с повышением концентрации субстанции У наблюдалась тенденция нарастания хемилилюминесценции вплоть до отсутствия латентного периода, пик нарастания длительный и выше контроля (рисунок 4 и таблица 2).

Таблица 2. Результаты хемилилюминесцентного анализа

Table 2. Results of chemiluminescence analysis

Образец Sample	Концентрация У, г/система Concentration Y, g/system	ПИХ, % PCI, %	ОАА, ЕД кверцетина GAA, AU of quercetin			ОАА _{пих} , ЕД кверцетина GAA _{PCI} , AU of quercetin		
Количество кверцетина в исследуемой системе, г The amount of quercetin in the system under study, g			1,02 · 10 ⁻⁹ г	2,04 · 10 ⁻⁹	2,04 · 10 ⁻¹⁰	1,02 · 10 ⁻⁹	2,04 · 10 ⁻⁹	2,04 · 10 ⁻¹⁰
Субстанция У Substance Y	6 · 10 ⁻⁴	Вызывает быстрый и длительный рост хемилилюминесценции без латентного периода: предположительно продукция окислителей Causes a rapid and prolonged increase in chemiluminescence without a latency period: presumably the production of oxidants						
	6 · 10 ⁻⁶	30,5 ± 1,2	44,12	87,70	8,18	8,33	13,67	0,73
	1,2 · 10 ⁻⁶	28 ± 3,1	216,36	430,92	39,67	24,30	14,93	2,14
	6 · 10 ⁻⁷	22,5 ± 2,6	458,65	908,40	86,84	30,24	18,66	-2,66

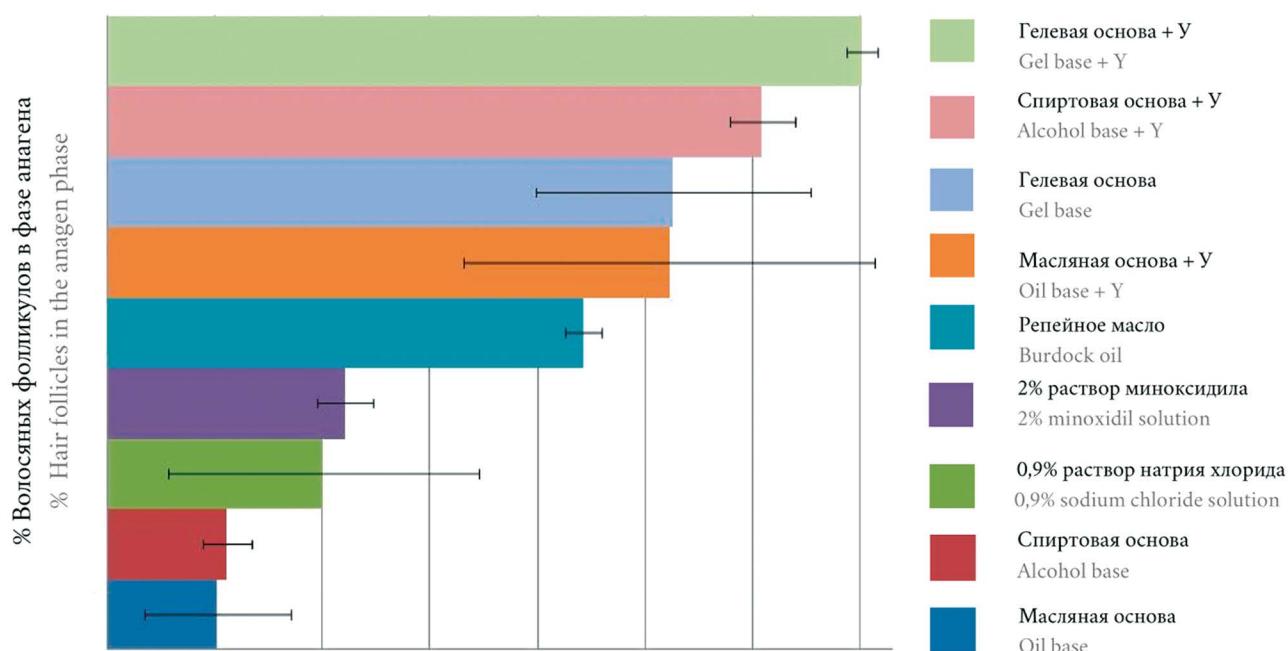


Рисунок 3. Влияние препаратов на число волосяных фолликулов в фазе роста (M ± m, n = 8)

Figure 3. The effect of drugs on the number of hair follicles in the growth phase (M ± m, n = 8)

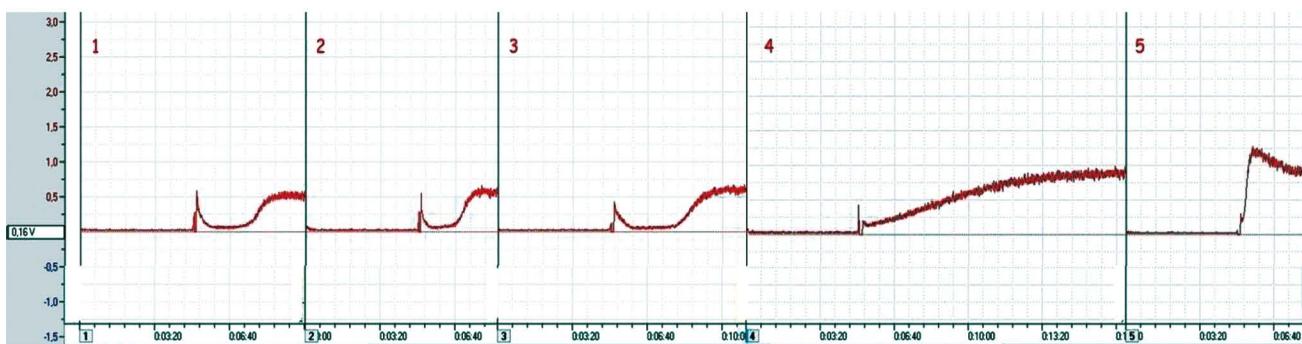


Рисунок 4. Графическая зависимость интенсивности хемилюминесценции во времени:

1 – кверцетин 1,02e-9; 2 – кверцетин 2,04e-9; 3 – кверцетин 2,04e-10; 4 – субстанция У 6е-4; 5 – субстанция У 6е-6

Figure 4. Graphical dependence of the intensity of chemiluminescence in time:

1 – quercetin 1.02e-9; 2 – quercetin 2.04e-9; 3 – quercetin 2.04e-10; 4 – substance Y 6e-4; 5 – substance Y 6e-6

Хемилюминесцентный анализ антиоксидантной активности субстанции У, проводимый в сравнении с природным антиоксидантом кверцетином, позволил опровергнуть гипотезу об антиоксидантной активности исследуемого вещества. Следует предположить, что вещество У обладает иным механизмом действия, что требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для исследуемого компонента У были разработаны составы гелевой, спиртовой и масляной форм. Субстанция показала выраженную способность стимулировать рост волос на двух тест-системах (кролики и мыши). Сравнение эффективности исследуемого вещества в трёх ЛФ показало, что наибольший клинический эффект наблюдается при использовании геля, меньший при нанесении спиртового раствора и минимальный – в случае применения масляной формы. Сопоставление результатов гистологического анализа свидетельствует о том, что гель с компонентом У эффективнее 2 % раствора миноксида (различия статистически значимы). Хемилюминесцентный анализ показал, что фармакологическое действие испытуемого вещества У не связано с антиоксидантной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

- Phillips T. G., Slomiany W. P., Allison R. Hair loss: common causes and treatment. *American Family Physician*. 2017;96(6):371–378.
- Tai T., Kochhar A. Physiology and medical treatments for alopecia. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2020;28(2):149–159. DOI: 10.1016/j.fsc.2020.01.004.
- Asnaashari S., Javadzadeh Y. Herbal medicines for treatment of androgenic alopecia. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2020;26(4):27–35.
- Cardoso C. O., Tolentino S., Gratieri T., Cunha-Filho M., Lopez R., Gelfuso G. M. Topical treatment for scarring and non-scarring alopecia: an overview of the current evidence. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2021;14:485–499. DOI: 10.2147/CCID.S284435.
- Ивкин Д. Ю., Ногаева У. В., Флисюк Е. В., Писецкая М. В., Штырлин Ю. Г. Аlopекия: от клиники к доклинике и обратно. *Формулы Фармации*. 2019;1(1):44–51. DOI: 10.17816/phf18524.
- Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):59–66. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66.
- Тринеева О. В. Сравнительная характеристика определения антиоксидантной активности плодов облепихи крушиновидной различными методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):48–52. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-48-52.
- Вишнякова Х. С., Веткова Л. Г., Алипер А. М., Жаворонков А. А., Снежкина А. В., Кудрявцева А. В., Попов К. В., Егоров Е. Е. Действие средства для стимуляции роста волос направлено, вероятно, против старения волоссяных фолликулов: эксперименты на мышах и транскриптомный анализ. *Успехи геронтологии*. 2014;4:631–636.
- Zhang Y., Wanga J., Qua F., Zhang Yu., Su G., Zhao Yu. Hair growth promotion effect of cedrol cream and its dermatopharmacokinetics. *RSC Advances*. 2018;8:42170–42178. DOI: 10.1039/C8RA08667B.
- Stoehr J. R., Choi J. N., Colavincenzo M., Vanderweil S. Off-label use of topical minoxidil in alopecia: A Review. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2019;20(2):237–250. DOI: 10.1007/s40257-018-0409-y.
- Олисова О. Ю. Миноксидил в практике врача трихолога. *Медицинский совет*. 2018;6:145–147. DOI: 10.21518/2079-701X-2018-6-145-147.
- Park K. S., Park D. H. Comparison of Saccharina japonica–Undaria pinnatifida mixture and minoxidil on hair growth promoting effect in mice. *Archives of Plastic Surgery*. 2016;6:498–505. DOI: 10.5999/aps.2016.43.6.498.
- Ciatte J. F., Laux B., Simpson N. B., Vickers C. F. 2 % topical minoxidil solution in male-pattern baldness: preliminary European results. *Dermatologica*. 1987;175(2):42–49. DOI: 10.1159/000248902.
- Ouzir M., Bernoussi S. E., Tabyaoui M., Taghzouti K. Almond oil: a comprehensive review of chemical composition, extraction methods, preservation conditions, potential health benefits, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(4):3344–3387. DOI: 10.1111/1541-4337.12752.
- Гладышев В. В., Гнитко И. В., Лисянская А. П., Дюдон А. Д. Изучение интенсивности высвобождения миноксида из мазевых основ. *Актуальные проблемы медицины*. 2014;24(195):242–245.
- Ahmed G., Khare S., Ganguly S., Chhabra N., Prabha N. Topical methotrexate 1 % gel for the treatment of localized alopecia areata. *International Journal of Dermatology*. 2020;59(8):292–293. DOI: 10.1111/ijd.14898.

REFERENCES

1. Phillips T. G., Slomiany W. P., Allison R. Hair loss: common causes and treatment. *American Family Physician*. 2017;96(6):371–378.
2. Tai T., Kochhar A. Physiology and medical treatments for alopecia. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2020;28(2):149–159. DOI: 10.1016/j.fsc.2020.01.004.
3. Asnaashari S., Javadzadeh Y. Herbal medicines for treatment of androgenic alopecia. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2020;26(4):27–35.
4. Cardoso C. O., Tolentino S., Gratieri T., Cunha-Filho M., Lopez R., Gelfuso G. M. Topical treatment for scarring and non-scarring alopecia: an overview of the current evidence. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2021;14:485–499. DOI: 10.2147/CCID.S284435.
5. Ivkin D. Yu., Nogaeva U. V., Flisyuk E. V., Pisetskaya M. V., Shtyrlin Yu. G. Alopecia: from clinic to preclinic and back. *Formuly Farmatsii = Pharmacy Formulas*. 2019;1(1):44–51. (In Russ.) DOI: 10.17816/phf18524.
6. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Safonova E. F. Determination of the antioxidant activity of extracts from the leaves of stinging nettle by various methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):59–66. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66.
7. Trineeva O. V. Comparative characteristics of determination of antioxidant activity of sea buckthorn fruits by different methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(4):48–52. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-48-52.
8. Vishnyakova Kh. S., Vetkova L. G., Aliper A. M., Zhavoronkov A. A., Snezhkina A. V., Kudryavtseva A. V., Popov K. V., Egorov E. E. The effect of the agent for stimulating hair growth is probably directed against the aging of hair follicles: experiments in mice and transcriptome analysis. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*. 2014;4:631–636. (In Russ.)
9. Zhang Y., Wang J., Qua F., Zhang Yu., Su G., Zhao Yu. Hair growth promotion effect of cedrol cream and its dermatopharmacokinetics. *RSC Advances*. 2018;8:42170–42178. DOI: 10.1039/C8RA08667B.
10. Stoehr J. R., Choi J. N., Colavincenzo M., Vanderweil S. Off-label use of topical minoxidil in alopecia: A Review. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2019;20(2):237–250. DOI: 10.1007/s40257-018-0409-y.
11. Olisova O. Yu. Minoxidil in the practice of a trichologist. *Meditinskiy sovet = Medical Council*. 2018;6:145–147. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2018-6-145-147.
12. Park K. S., Park D. H. Comparison of Saccharina japonica–Undaria pinnatifida mixture and minoxidil on hair growth promoting effect in mice. *Archives of Plastic Surgery*. 2016;6:498–505. DOI: 10.5999/aps.2016.43.6.498.
13. Civatte J. F., Laux B., Simpson N. B., Vickers C. F. 2 % topical minoxidil solution in male-pattern baldness: preliminary European results. *Dermatologica*. 1987;175(2):42–49. DOI: 10.1159/000248902.
14. Ouzir M., Bernoussi S. E., Tabyaoui M., Taghzouti K. Almond oil: a comprehensive review of chemical composition, extraction methods, preservation conditions, potential health benefits, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(4):3344–3387. DOI: 10.1111/1541-4337.12752.
15. Gladyshev V. V., Gnit'ko I. V., Lisyanskaya A. P., Dyudyun A. D. Study of the intensity of the release of minoxidil from ointment bases. *Aktual'nye problemy meditsiny = Challenges in modern medicine*. 2014;24(195):242–245. (In Russ.)
16. Ahmed G., Khare S., Ganguly S., Chhabra N., Prabha N. Topical methotrexate 1 % gel for the treatment of localized alopecia areata. *International Journal of Dermatology*. 2020;59(8):292–293. DOI: 10.1111/ijd.14898.



Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс

В. А. Приходько^{1,2*}, А. В. Кан¹, Ю. И. Сысоев^{1,2,3,4}, И. А. Титович¹, Н. А. Анисимова¹, С. В. Оковитый^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтеревой Российской академии наук», 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12А

³ Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9, пом. 1050

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук», 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

*Контактное лицо: Приходько Вероника Александровна. E-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: В. А. Приходько – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; А. В. Кан – <https://orcid.org/0000-0002-7833-9878>; Ю. И. Сысоев – <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>; И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Н. А. Анисимова – <https://orcid.org/0000-0002-2620-2976>; С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 13.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Поиск и изучение новых лекарственных средств, способных снижать выраженность неврологического дефицита у пациентов, перенесших черепно-мозговую травму, является актуальной задачей фармакологии. Среди потенциальных нейропротекторных средств следует отметить хромонсодержащие производные аллилморфолина, для которых *in vitro* была показана блокирующая активность в отношении ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и рецепторов N-метил-D-аспартата.

Цель. Оценка нейропротекторной активности производного аллилморфолина (*E*)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4Н-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида (33b) *in vivo* на модели черепно-мозговой травмы у крыс.

Материалы и методы. Черепно-мозговую травму у крыс моделировали методом контролируемого кортикального удара. Производное аллилморфолина вводили в дозах 1, 10 и 50 мг/кг внутрибрюшинно спустя час после травмы и далее 1 раз в сутки в течение 6 дней. Степень неврологического дефицита у животных оценивали в тестах «Стимулирование конечностей», «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Сужающаяся дорожка» и «Цилиндр».

Результаты и обсуждение. Производное аллилморфолина ни в одной из вводимых доз не оказывало положительного влияния на двигательную функцию или исследовательское поведение травмированных животных. Доза 10 мг/кг вызывала у травмированных животных снижение исследовательской активности в teste «Приподнятый крестообразный лабиринт», что согласуется с ранее показанным седативным действием изучаемого соединения у рыб *Danio rerio*.

Заключение. В настоящем исследовании было показано отсутствие нейропротекторного действия производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс, несмотря на показанную ранее *in vitro* активность по отношению к биологическим мишениям, играющим ведущую роль в развитии патологических процессов и функциональном восстановлении после черепно-мозговой травмы. Полученные результаты показывают важность проведения исследований потенциальных нейропротекторных средств *in vivo*.

Ключевые слова: производные аллилморфолина, черепно-мозговая травма, нейропротекция, нейропротекторные средства, нейропротекторная терапия, нейрофармакология

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

Вклад авторов. В. А. Приходько анализировала литературные данные, провела эксперименты, анализировала и интерпретировала данные, подготовила текст рукописи и иллюстрации. А. В. Кан, И. А. Титович анализировали литературные данные, провели эксперименты, анализировали данные, подготовили текст рукописи. Ю. И. Сысоев анализировал литературные данные, разработал дизайн исследования, анализировал и интерпретировал данные, подготовил и редактировал текст рукописи. С. В. Оковитый и Н. А. Анисимова разработали дизайн исследования, интерпретировали данные, редактировали текст рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Приходько В. А., Кан А. В., Сысоев Ю. И., Титович И. А., Анисимова Н. А., Оковитый С. В. Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):179–187. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-179-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187)

Evaluation of the Neuroprotective Activity of a New Allylmorpholine Derivative in a Rat Model of Traumatic Brain Injury

Veronika A. Prikhodko^{1,2}, Aleksandra V. Kan¹, Yury I. Sysoev^{1,2,3,4}, Irina A. Titovich¹, Natalia A. Anisimova¹, Sergey V. Okovityi^{1,2}

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, 12A, Akademik Pavlov str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, 7-9/1050, Universitetskaya emb., St. Petersburg, 199034, Russia

⁴ Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 6, Makarova emb., St. Petersburg, 199034, Russia

*Corresponding author: Veronika A. Prikhodko. E-mail: veronika.prikhodko@pharmmnotech.com

ORCID: Veronika A. Prikhodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Aleksandra V. Kan – <https://orcid.org/0000-0002-7833-9878>; Yuriy I. Sysoev – <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Natalia A. Anisimova – <https://orcid.org/0000-0002-2620-2976>; Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Received: 20.10.2021

Revised: 13.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. The search for and development of new drugs capable of reducing the severity of neurological deficit in traumatic brain injury are a critical task for investigational pharmacology. Chromone-containing allylmorpholines are a new group of neuroprotective drug candidates that have been shown to inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, and block N-methyl-D-aspartate receptors *in vitro*.

Aim. This study aimed to evaluate the neuroprotective activity of the allylmorpholine derivative (*E*)-4-[3-(8-bromo-6-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)-1-cyclohexylallyl]morpholin-4-ium chloride (33b) *in vivo* using a rat model of traumatic brain injury.

Materials and methods. Traumatic brain injury was induced using the controlled cortical impact model. The allylmorpholine derivative was administered intraperitoneally at 1, 10, or 50 mg × kg⁻¹ b.w. at 1 h after trauma induction, and then daily for the next 6 d. The neurological deficit was assessed using the Limb Placing, Open Field, Elevated Plus Maze, Beam Walking, and Cylinder tests.

Results and discussion. At all doses administered, the allylmorpholine derivative had no positive effect on the motor function or exploratory behavior following traumatic brain injury. In the Elevated Plus Maze, 10 mg × kg⁻¹ b.w. of the compound further suppressed exploratory behaviour in the injured animals, which appears to be consistent with its sedative properties observed previously in zebrafish.

Conclusion. Despite the previously described *in vitro* affinity of allylmorpholines towards several molecular targets crucial for the pathogenesis of brain trauma and posttraumatic functional recovery, an allylmorpholine derivative had no neuroprotective effect in a rat model of traumatic brain injury in this study. These results further emphasize the importance of *in vivo* evaluation of potential neuroprotective drug candidates.

Keywords: allylmorpholines; allylmorpholine derivatives; brain injuries, traumatic; neuroprotection; neuroprotective agents; neurological rehabilitation; neuropharmacology

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. Veronika A. Prikhodko analyzed the literature, conducted the experiments, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and prepared the figures. Aleksandra V. Kan and Irina A. Titovich analyzed the literature, conducted the experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. Yuriy I. Sysoev analyzed the literature, designed the study, analyzed and interpreted the data, drafted and reviewed the manuscript. Sergey V. Okovityi and Natalia A. Anisimova designed the study, interpreted the data, and reviewed the manuscript.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Prikhodko V. A., Kan A. V., Sysoev Yu. I., Titovich I. A., Anisimova N. A., Okovityi S. V. Evaluation of the neuroprotective activity of a new allylmorpholine derivative in a rat model of traumatic brain injury. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4–1):179–187. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-179-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187)

ВВЕДЕНИЕ

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих проблем современного здравоохранения ввиду высокого уровня летальности, инвалидизации и высокой распространенности среди разных слоев населения, что наносит значительный социальный и экономический ущерб. По современным оценкам, общемировая ежегодная заболеваемость ЧМТ вне зависимости от этиологии и степени тяжести составляет около 939 случаев на 100 тыс., а распространенность – до 15 % населения [1]. Общая летальность при ЧМТ составляет 5–10%; при тяжелых ЧМТ летальный исход наблюдается у 41–85 % пациентов. Последствиями ЧМТ могут быть нарушения двигательной функции, когнитивный и миастический дефицит, снижение или полная потеря работоспособности [2]. Для лечения ЧМТ, восстановления в посттравматический период и предотвращения развития осложнений необходимо проведение рациональной меди-

каментозной терапии с использованием нейропротекторных средств различных групп. Фармакологическая нейропротекция преимущественно направлена на коррекцию метаболизма нейронов, а также повышение их устойчивости в условиях кислородного и энергетического дефицита [3]. В настоящее время в рамках комплексной травматической реабилитации после ЧМТ возможно применение ноотропных средств, антигипоксантов и антиоксидантов, которые предотвращают или уменьшают образование свободных радикалов, повышают выживаемость нейронов головного мозга в условиях гипоксии или ишемии, увеличивают концентрацию ацетилхолина в головном мозге, предотвращают активацию процессов перекисного окисления липидов [4]. Тем не менее, уровень доказанности клинической эффективности и безопасности нейропротекторных препаратов указанных групп, представленных на современном фармацевтическом рынке, остается недостаточным [5]. В связи с вышесказанным поиск и изучение новых ле-

карственных средств с нейропротекторной активностью являются актуальной задачей современной экспериментальной фармакологии [6, 7].

Потенциальный интерес для изучения в качестве средств коррекции последствий ЧМТ представляют хромонсодержащие производные аллилморфолина (ПАМ), впервые полученные на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ). Для данных соединений была показана *in vitro* блокирующая активность в отношении ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и рецепторов N-метил-D-аспартата [8]. Согласно литературным данным, производные морфолина различной структуры способны повышать жизнеспособность нейронов головного мозга, способствуя нормализации двигательной активности, когнитивных и мнестических функций при травматических, ишемических и дегенеративных поражениях центральной нервной системы [9]. Вышесказанное позволяет предположить наличие нейропротекторной активности у ПАМ.

Целью настоящего исследования было изучение нейропротекторной активности производного аллилморфолина (*E*-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4Н-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]-морфолин-4-ия хлорида (33b) *in vivo* на модели ЧМТ у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.16 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» после одобрения биоэтической комиссией СПХФУ. Эксперименты были выполнены на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, полученных из ФГУП ПЛЖ «Раполово» (Ленинградская обл., РФ) из одного привоза и прошедших карантин в течение

14 д. Крысы получали корм «Полнорационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», РФ) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*. Непосредственно перед началом исследования животные были рандомизированы методом случайных чисел на 5 групп: интактная (Интакт; NaCl 0,9%, $n = 10$), контрольная (Контроль; ЧМТ + NaCl 0,9%, $n = 10$), ЧМТ + 33b 1 мг/кг ($n = 10$), ЧМТ + 33b 10 мг/кг ($n = 10$) и ЧМТ + 33b 50 мг/кг ($n = 10$).

Эксперименты проводили в соответствии со схемой, изображенной на рисунке 1.

ЧМТ моделировали методом контролируемого кортикального удара у животных контрольной и опытных групп. Крыс наркотизировали с помощью внутрибрюшинной инъекции раствора хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг. Осуществляли трепанацию в левой лобной части черепа над зоной двигательной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 3,0 мм ростральнее и 2,0 мм медиальнее брегмы. Далее в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3,0 мм и высотой 10 см, с ходом 4,0 мм, по которому груз весом 50 г, проскальзывая в стальной трубке, совершал удар. Высверленную черепную пластину возвращали на место и ушивали разрез кожи. Шов обрабатывали антисептическим средством (5 % раствором йода) непосредственно после наложения и в течение последующих 6 дней [10].

(*E*-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4Н-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорид (33b) (рисунок 2) вводили внутрибрюшинно в виде свежеприготовленных водных растворов (1 мг/кг) или суспензии (10, 50 мг/кг; эмульгатор твин-80) через 1 ч после индукции ЧМТ и далее 1 р/д в течение последующих



Рисунок 1. Схема эксперимента.

ЧМТ – черепно-мозговая травма; ЛС – лекарственные средства; СК – «Стимулирование конечностей»; ОП – «Открытое поле»; ПКЛ – «Приподнятый крестообразный лабиринт»; СД – «Сужающаяся дорожка»

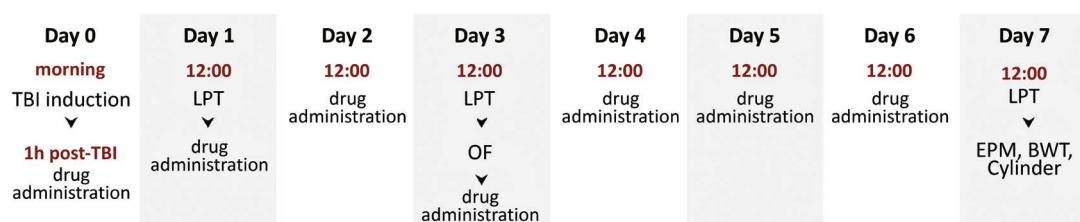


Figure 1. Experimental schedule.

TBI – traumatic brain injury; LPT – Limb Placing test; OF – Open Field; EPM – Elevated Plus Maze; BWT – Beam Walking test

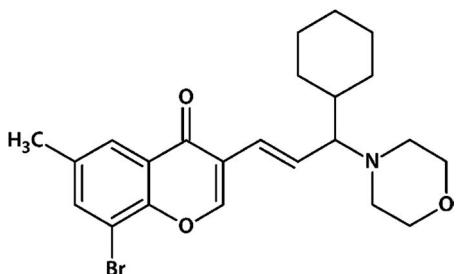


Рисунок 2. Структурная формула (E)-4-[3-(8-бромо-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида (33b)

Figure 2. Structural formula of (E)-4-[3-(8-bromo-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-3-yl)-1-cyclohexylallyl]morpholin-4-ium chloride (33b)

6 дней. Интактным и контрольным животным вводили физиологический раствор в эквиобъемных количествах в том же режиме.

На 1-е, 3-и и 7-е сутки после травмы у крыс оценивали выраженность неврологического дефицита с помощью теста «Стимулирование конечностей» (СК). Данный тест заключался в оценке ответа передней и задней контралатеральных конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию в 7 последовательных испытаниях. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 с и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Итоговый результат представляли в виде суммы баллов; максимально возможное количество баллов было равно 14 [11].

На 3-и сутки оценивали общую двигательную и исследовательскую активность в teste «Открытое поле» (ОП), фиксируя передвижения животных в установке (ООО «НПК Открытая наука», Россия) при помощи видеокамеры в течение 3 мин. Автоматическую обработку полученных видеозаписей в ОП осуществляли с помощью программы VideoMot (TSE Systems, Германия). Оценивали пройденную дистанцию, среднюю скорость движения, число посещенных участков поля, число замираний, суммарное время замираний, время нахождения в центре поля, количество грумингов, стоек и заглядываний в отверстия-«норки» [12].

На 7-е сутки проводили тесты СК, «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка» (СД). Тест ПКЛ позволяет оценить уровень тревожности, общей двигательной и исследовательской активности животных. Проводили видеокомпьютерную регистрацию передвижений животных в установке (ООО «НПК Открытая наука», Россия) в течении 3 минут, после чего определяли в ручном режиме время нахождения в открытых рукавах (ОР), в закрытых рукавах (ЗР) и в центре, количество заходов в ОР и ЗР, количество стоек, грумингов, выглядываний из ЗР и свисаний с ОР [13].

В teste «Цилиндр» оценивали асимметрию использования животным передних конечностей в процессе исследования стенок цилиндра. Крысу помещали в прозрачный пластмассовый цилиндр (ООО «НПК Открытая наука», Россия) и проводили видеорегистрацию ее движений. Время тестирования не ограничивали, добиваясь не менее 10 касаний стенок цилиндра. Просмотр видеозаписи проводили в покадровом режиме, подсчитывая количество актов независимого использования латеральной и контралатеральной к месту повреждения конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременного использования обеих лап. Результаты представляли как процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов (КЛ) и рассчитывали по формуле [14]:

$$КЛ = (Контр + 0,5 Одновр) / (Иpsi + Контр + + Одновр) \times 100,$$

где Контр – контралатеральная к месту повреждения конечность; Одновр – одновременное использование обеих передних конечностей; Иpsi – ипсилатеральная к месту повреждения конечность.

Тест СД позволяет оценить выраженность сенсомоторного дефицита передних и задних конечностей. Установка (ООО «НПК Открытая наука», Россия) представляет собой две плавно сужающиеся дорожки длиной 165 см, располагающиеся непосредственно друг под другом. Нижняя дорожка выполняет функцию платформы, на которой оказываются конечности животного во время соскальзывания с верхней дорожки. В конце дорожек находится черный ящик, который является конечной целью животного. Перед моделированием ЧМТ крыс обучали пересекать СД в течение 3 последовательных дней. Во время тестирования проводили запись движений животных на видеокамеру. Далее в покадровом режиме просмотра подсчитывали количество постановок контралатеральной к месту повреждения конечности на нижнюю дорожку (ошибок), количество соскальзываний с верхней дорожки на нижнюю и общее количество шагов. Посчет количества ошибок, количества соскальзываний и общее количество шагов для передней и задней контралатеральных конечностей проводили отдельно. Полученные в результате трех попыток данные усредняли, степень сенсомоторного дефицита (СМД) вычисляли по формуле и выражали в процентах [15]:

$$СМД = Ошибки + 0,5 \times Соскальзывания / / Общее количество шагов \times 100$$

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Prism 8.2 (GraphPad Software, США). Проверяли нормальность распределения количественных признаков с помощью W-критерия Шапиро – Уилка. Да-

лее оценивали значимость различий: при нормальном распределении количественных признаков с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с *post hoc* тестом по Тьюки, при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с *post hoc* тестом по Данну. Числовые данные приведены в таблицах как среднее арифметических (M) ± ошибка среднего (m). В тесте СК данные представлены как медиана (нижний quartиль; верхний quartиль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вследствие травматического повреждения двигательной коры и нижележащих структур у крыс отмечалось выраженное угнетение двигательной функции, а также исследовательской активности. В тесте СК у травмированных животных по сравнению с интактными наблюдался выраженный двигательный дефицит передних и задних конечностей на 1-е, 3-е и 7-е сутки после травмы. В целом, ни в одной из доз введение ПАМ не приводило к снижению степени двигательных нарушений в данном тесте. Однако следует отметить, что в группе, получавшей соединение в дозе 10 мг/кг, происходило частичное восстановление двигательной функции передних и задних конечностей на 7-е сутки в среднем на 38,6 % ($p < 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1. Влияние производного аллилморфолина 33b на функцию конечностей животных в teste «Стимулирование конечностей»

Table 1. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on animal limb function in the Limb Placing test

Группа Group	1-й день Day 1	3-й день Day 3	7-й день Day 7
Интакт Intact	14 (14;14)**	14 (14;14)**	14 (14;14)**
Контроль Control	1,5 (0;5)	1,4 (0;5)	3,9 (1;6)
33b 1 мг/кг 33b 1 mg · kg ⁻¹	0,9 (0;2)	2,0 (0;6)	4,8 (2;7)
33b 10 мг/кг 33b 10 mg · kg ⁻¹	1,1 (0;5)	2,8 (0;5)	5,4 (3;10)*
33b 50 мг/кг 33b 50 mg · kg ⁻¹	0,7 (0;4)	1,8 (0;5)	4,9 (0;10)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с значением контрольной группы; ** $p < 0,01$ по сравнению с значением контрольной группы.

Note. * $p < 0,05$ vs. Control; ** $p < 0,01$ vs. Control.

В teste ОП ЧМТ у крыс приводила к снижению двигательной и поисково-исследовательской активности по сравнению с интактной группой, что проявлялось в уменьшении количества грумингов на 74 % ($p < 0,05$) и заглядываний в норки на 96 % ($p < 0,01$). Стоит отметить тенденцию к снижению пройденной дистанции и количества стоеч у таких животных, а также увеличению времени нахождения в центре ОП. ПАМ в диапазоне изучаемых доз не оказывало статистически значимого влияния на поведение травмированных животных в данном teste (рисунок 3).

В teste ПКЛ не было выявлено каких-либо статистически значимых изменений поведения на 7-е сутки после ЧМТ у травмированных крыс. ПАМ в дозе 10 мг/кг у животных с травмой уменьшало количество заходов в ЗР и свисаний на 74 % и 80 % соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях) (рисунок 4).

Несмотря на отсутствие статистической значимости, в teste «Цилиндр» частота использования контралатеральной конечности имела выраженную тенденцию к снижению у животных, перенесших ЧМТ. Как и в предыдущих тестах, изучаемое соединение не оказывало какого-либо положительного эффекта на двигательную функцию передней лапы, расположенной контралатерально к месту повреждения (рисунок 5).

В teste СД у травмированных крыс степень сенсомоторного дефицита передних и задних конечностей достигала 40 % ($p < 0,01$ по сравнению с Интактом в обоих случаях). ПАМ ни в одной из доз не оказывало значимого влияния на двигательную функцию животных с ЧМТ (рисунок 6).

Несмотря на подтвержденные *in vitro* молекулярные механизмы действия ПАМ 33b [8], в настоящем исследовании не было обнаружено нейропротекторной активности у этого соединения на модели ЧМТ у крыс в дозах 1, 10 или 50 мг/кг. Наблюдаемые положительные эффекты дозы 10 мг/кг в teste СК не были подтверждены в других, более объективных тестах. Наиболее вероятными причинами отсутствия нейропротекторного действия могут быть особенности фармакокинетики, в частности – метаболизма соединения 33b, не учтенные дизайном исследования.

Указанные дозы были выбраны с учетом предварительно определенного значения медианной летальной дозы LD₅₀ 33b при внутрибрюшинном введении (320 ± 30 мг/кг для мышей). В пользу потенциальной эффективности выбранных доз свидетельствует наличие центральной активности у данного соединения и его аналогов в эквивалентных диапазонах концентраций у рыб *Danio rerio* [16–18].

Выбранный режим введения ранее позволил добиться реализации нейропротекторного эффекта экспериментальных соединений 6-оксо-1-фенил-2-фениламино-1,6-дигидропиридин-4-ола (мафедина) [19, 20] и [(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (ФДЭС) [10], однако может не являться оптимальным для группы ПАМ. Кроме этого, биодоступность 33b при внутрибрюшинном введении может быть снижена ввиду недостаточной растворимости соединения в воде и низкой системной абсорбции из крупнодисперсных супензий, склонных к расслоению. Так, для производных морфолина AK295 [21] и LM11A-31 [22], продемонстрировавших нейропротекторную активность на моделях ЧМТ у крыс, были использованы альтернативные пути (интраартериальный, интраназальный) и режимы введения, а вводимые препараты имели форму растворов.

С другой стороны, недостаточное проникновение соединения 33b через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), напротив, представляется маловероятным.

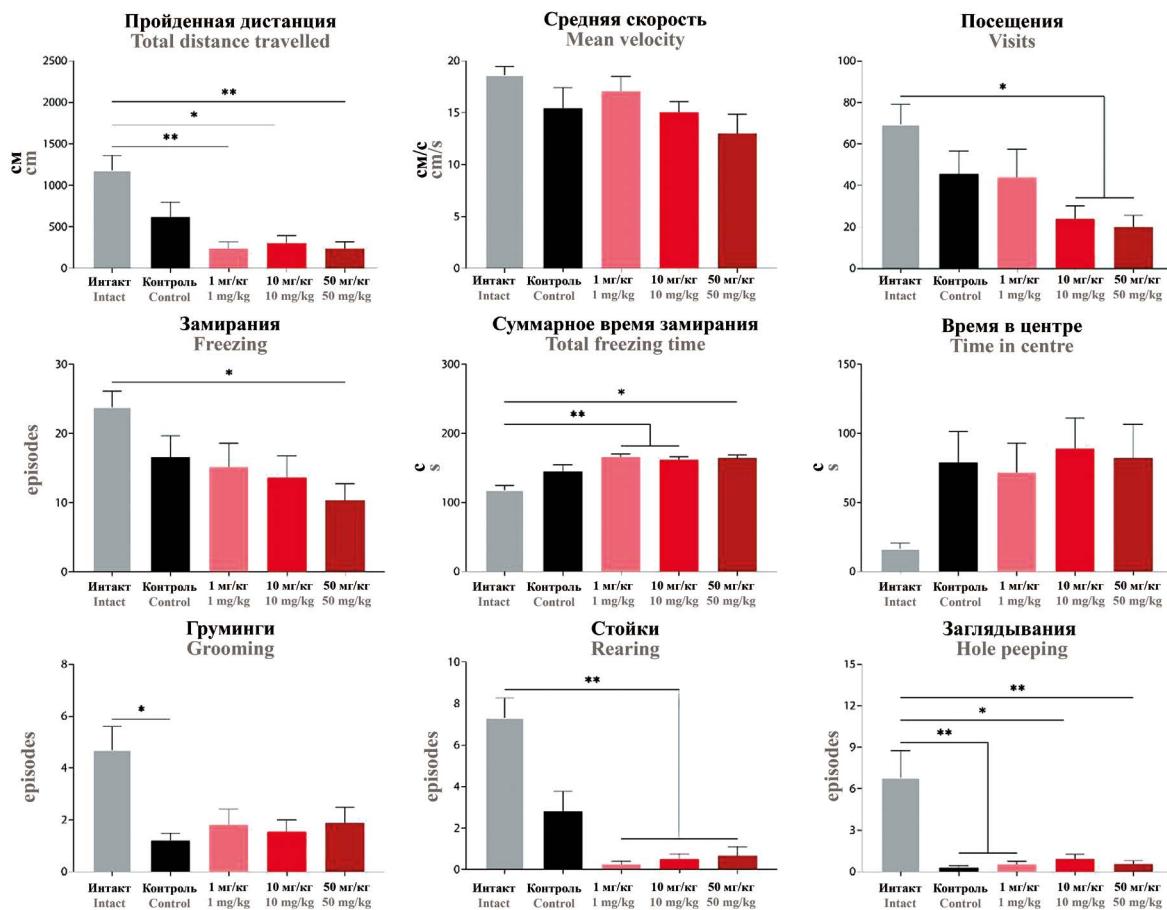


Рисунок 3. Влияние производного аллилморфолина 33b на двигательную и исследовательскую активность животных в teste «Открытое поле».

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figure 3. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on animal locomotion and exploratory behaviour in the Open Field.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Методами *in silico* установлено, что наличие морфолинового фрагмента способствует увеличению липофильности молекул и облегчает их диффузию через мембранны ГЭБ [23–26]. Для ЧМТ также характерно патологическое увеличение проницаемости ГЭБ, достаточное для попадания в церебральный кровоток значительных количеств даже таких высокомолекулярных соединений, как белки или нуклеиновые кислоты [27]. Кроме этого, проникновение 33b в центральную нервную систему косвенно подтверждается развитием седации, наблюдавшейся в teste ПКЛ в настоящем исследовании, а также продемонстрированной ранее для других ПАМ в эквивалентных концентрациях в серии скрининговых экспериментов на *Danio rerio* [16–18].

Возможной причиной отсутствия ожидаемого нейропротекторного эффекта ПАМ 33b *in vivo* может быть его биотрансформация с образованием метаболитов, обладающих иным характером действия. Наряду с другими факторами, невозможность воспроизведения фармакокинетических процессов, протекающих в живом организме, является одним из основных недостатков тест-систем *in vitro* [28]. Ввиду это-

го, несмотря на их популярность и некоторые безусловные преимущества, скрининговые исследования *in vitro* являются лишь предварительной стадией для оценки возможности и необходимости последующих исследований эффективности и безопасности лекарственных средств *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании было показано отсутствие нейропротекторного действия производного аллилморфолина 33b на модели ЧМТ у крыс, несмотря на показанную ранее *in vitro* активность в отношении нескольких биологических мишней, играющих ведущую роль в развитии патологических процессов и функциональном восстановлении после ЧМТ. Наиболее вероятными причинами отсутствия нейропротекторного действия могут быть особенности фармакокинетики, в частности – метаболизма соединения 33b, не учтенные дизайном исследования. Полученные результаты подчеркивают важность проведения оценки эффективности и безопасности потенциальных нейропротекторных средств *in vivo*.

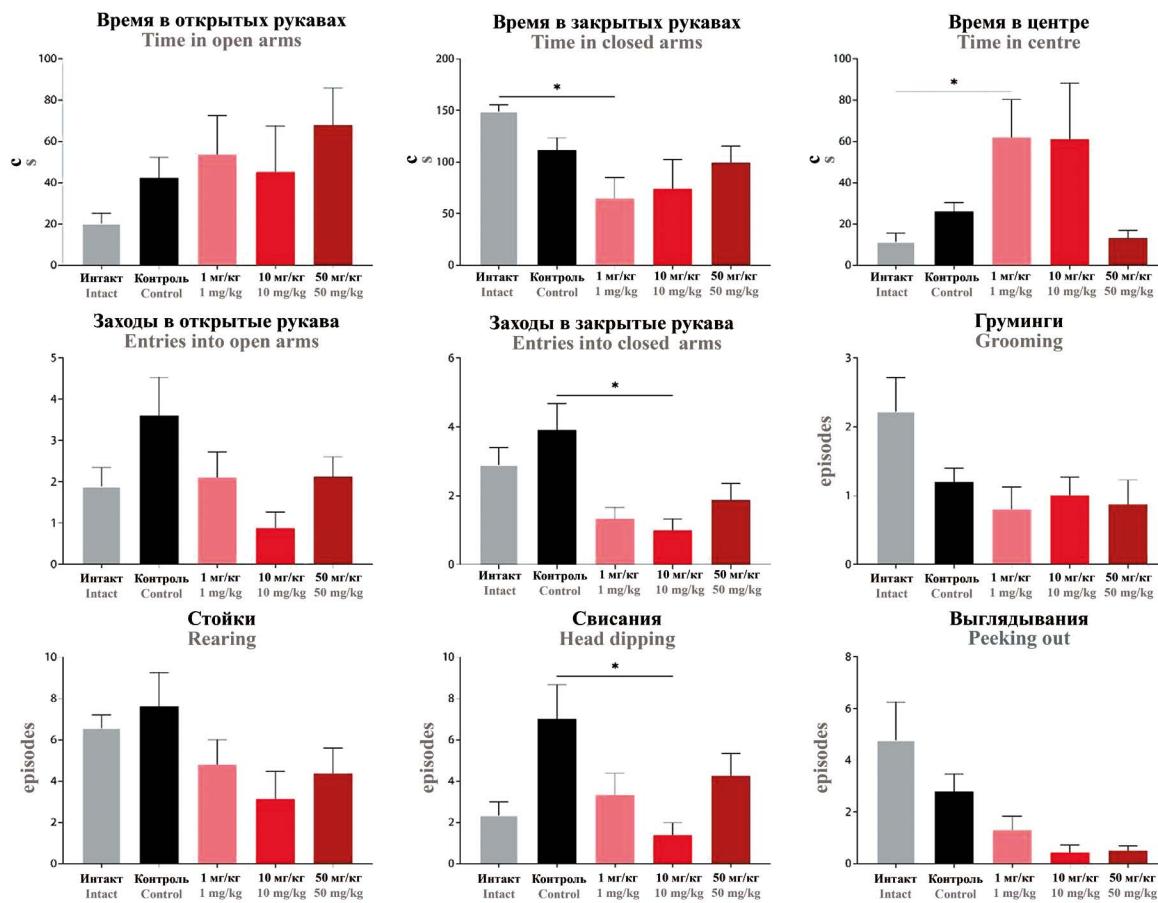


Рисунок 4. Влияние производного аллилморфолина 33b на исследовательскую активность и уровень тревожности животных в teste «Приподнятый крестообразный лабиринт».

* p < 0,05

Figure 4. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on animal exploratory and anxiety-like behaviour in the Elevated Plus Maze.

* p < 0,05

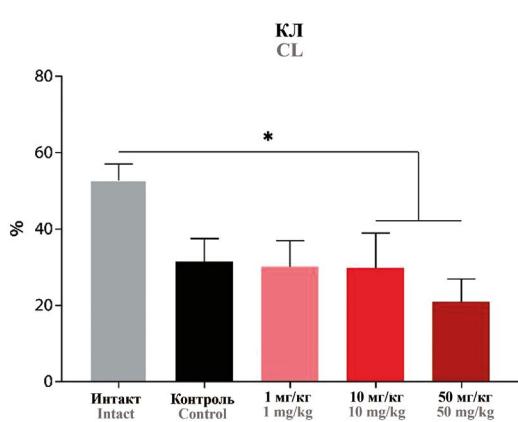


Рисунок 5. Влияние производного аллилморфолина 33b на функцию передней контралатеральной к месту повреждения конечности животных в teste «Цилиндр».

КЛ – процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов; * p < 0,05.

Figure 5. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on the function of the forelimb contralateral to the injury in the Cylinder test.

CL – percent use of the contralateral forelimb; * p < 0.05

ЛИТЕРАТУРА

1. Dewan M. C., Rattani A., Gupta S., Baticulon R. E., Hung Y.-C., PUNCHAK M., Agrawal A., Adeleye A. O., Shrima M. G., Rubiano A. M., Rosenfeld J. V., Park K. B. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2018;11-18. DOI: 10.3171/2017.10.JNS17352.
2. Крылов В. В., Петриков С. С., Талыпов А. Э., Пурас Ю. В., Соловьев А. А., Левченко О. В., Григорьева Е. В., Кордонский А. Ю. Современные принципы хирургии тяжелой черепно-мозговой травмы. *Журнал им. Н. В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2013;(4):39-47.
3. Loane D. J., Stoica B. A., Faden A. I. Neuroprotection for traumatic brain injury. *Handbook of Clinical Neurology*. 2015;127:343-366. DOI: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00022-2.
4. Потапов А. А., Лихтерман Л. Б., Кравчук А. Д., Охлопков В. А., Александрова Е. В., Филатова М. М., Марягин А. Д., Латышев Я. А. Легкая черепно-мозговая травма: клинические рекомендации. Москва: Ассоциация нейрохирургов России; 2016. 23 с.
5. Потапов А. А., Крылов В. В., Гаврилов А. Г., Кравчук А. Д., Лихтерман Л. Б., Петриков С. С., Талыпов А. Э., Захарова Н. Е., Ошоров А. В., Сычев А. А., Александрова Е. В., Соловьев А. А. Рекомендации по диагностике и лечению тяжелой черепно-мозговой травмы. Часть 2. Интенсивная терапия и нейромониторинг. *Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н. Н. Бурденко*. 2016;80(1):98-106. DOI: 10.17116/neiro201680198-106.
6. Тюренков И. Н., Куркин Д. В., Литвинов А. А., Логвинова Е. А., Морковин Е. И., Бакулин Д. А., Волотова Е. В. Методы моделирования острых нарушений мозгового кровообращения, при-

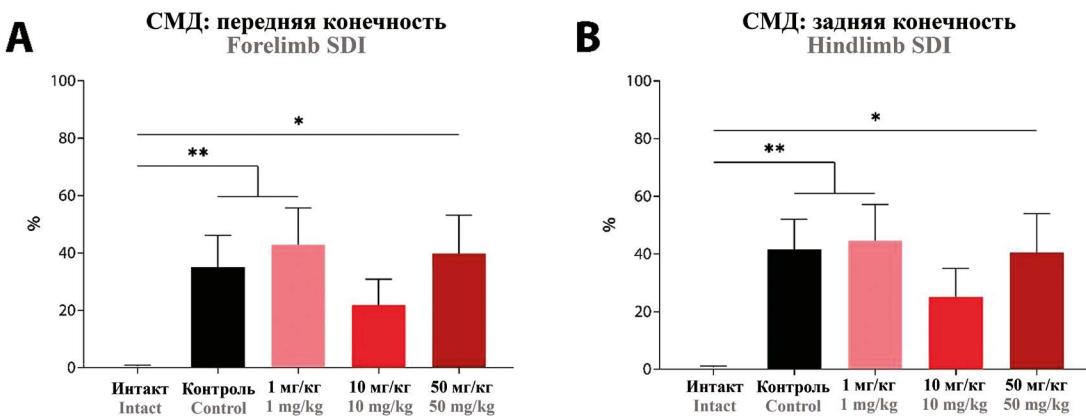


Рисунок 6. Влияние производного аллилморфолина 33b на функцию передней (А) и задней (В) контрапатеральных к месту повреждения конечностей животных в teste «Сужающаяся дорожка».

СМД – степень сенсомоторного дефицита; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figure 6. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on the function of the forelimb (A) and hindlimb (B) contralateral to the injury in the Beam Walking test.

SDI – Sensorimotor Deficit Index; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

- меняемые при проведении доклинических исследований цербропротекторов. *Разработки и регистрация лекарственных средств*. 2018;(1):186–197.
7. Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработки и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):18–22. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
 8. Chernov N. M., Shutov R. V., Barygin O. I., Dron M. Y., Starova G. L., Kuz'mich N. N., Yakovlev I. P. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type reaction. *European Journal of Organic Chemistry*. 2018;45:6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.
 9. Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Возможность применения производных морфолина в качестве средств коррекции неврологических нарушений при заболеваниях нервной системы. *Формулы Фармации*. 2020;2(1):16–35. DOI: 10.17816/phf21381/2713-153X-2020-1-2-16-35.
 10. Sysoev Yu. I., Uzuegbunam B. C., Okovityi S. V. Attenuation of neurological deficit by a novel ethanolamine derivative in rats after brain trauma. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2019;11:53–63. DOI: 10.2147/JEP.S199464.
 11. Jolkkonen J., Puurunen K., Rantaköni S., Häkkinen A., Haapalinna A., Sivenius S. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;400(2–3):211–9. DOI: 10.1016/s0014-2999(00)00409-x.
 12. Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*. 1976;83(3):482–504. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
 13. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–8. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
 14. Schallert T., Fleming S. M., Leisure J. L., Tillerson J. L., Bland S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):777–787. DOI: 10.1016/s0028-3908(00)00005-8.
 15. Schallert T., Woodlee M. T., Fleming S. M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury: Recovery of function. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 2002. 201–216 р.
 16. Приходько В. А., Никитенко А. А., Петров Д. В., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Влияние нового производного аллилморфолина на поведение *Danio rerio* в teste «Новый аквариум». Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической

науки и практики: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию фармацевтического факультета КемГМУ. 29 ноября 2019; Кемерово. Кемерово: КемГМУ; 2019. 416–419 с.

17. Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Влияние нового производного аллилморфолина на поведение рыб *Danio rerio* в teste «Новый аквариум». Материалы международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». 13 ноября 2020. Ташкент. 2020. 392–394 с.
18. Приходько В. А., Кан А. В. Влияние производных аллилморфолина на поведение *Danio rerio* в teste «Новый аквариум». «Молодая фармация – потенциал будущего», XI всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием. Сборник материалов конференции. Т. 1. 15 марта – 23 апреля 2021. Санкт-Петербург: СПХФУ; 2021. 67–68 с.
19. Сысоев Ю. И., Дагаев С. Г., Кубарская Л. Г., Гайкова О. Н., Узуегбунам Б. Ч., Модисе К., Маквана Т. Л., Оковитый С. В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мafeдина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
20. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idrayatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafeleine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sciences*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
21. Saatman K. E., Murai H., Bartus R. T., Smith D. H., Hayward N. J., Perri B. R., McIntosh T. K. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(8):3428–3433. DOI: 10.1073/pnas.93.8.3428.
22. Shi J., Longo F. M., Massa S. M. A small molecule p75(NTR) ligand protects neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cells*. 2013;31(11):2561–74. DOI: 10.1002/stem.1516.
23. Lenci E., Calugi L., Trabocchi A. Occurrence of morpholine in central nervous system drug discovery. *ACS Chemical Neuroscience*. 2021;12(3):378–390. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00729.
24. Kouronakis A. P., Xanthopoulos D., Tzara A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(2):709–752. DOI: 10.1002/med.21634.
25. Tzara A., Xanthopoulos D., Kouronakis A. P. Morpholine as a scaffold in Medicinal Chemistry: An update on synthetic strategies. *ChemMedChem*. 2020;15(5):392–403. DOI: 10.1002/cmdc.201900682.
26. Kumari A., Singh R. K. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:103578. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103578.

27. Washington J., Murcko R. M., Janigro D. Peripheral markers of TBI and blood-brain barrier disruption. In: Biomarkers for Traumatic Brain Injury. Cambridge, MA: Academic Press; 2020. 43–54 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-816346-7.00004-X.
28. Bracken M. B. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2009;102(3):120–122. DOI: 10.1258/jrsm.2008.08k033.

REFERENCES

1. Dewan M. C., Rattani A., Gupta S., Baticulon R. E., Hung Y.-C., Punchak M., Agrawal A., Adeleye A. O., Shrimi M. G., Rubiano A. M., Rosenfeld J. V., Park K. B. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2018;118. DOI: 10.3171/2017.10.JNS17352.
2. Krylov V. V., Petrikov S. S., Talyarov A. E., Puras Yu. V., Solodov A. A., Levchenko O. V., Grigoryeva E. V., Kordonkiy A. Yu. modern principles of surgery severe craniocerebral trauma. *Zhurnal im. N. V. Sklifosovskogo "Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch" = Russian Sklifosovsky Journal "Emergency Medical Care"*. 2013;(4):39–47. (In Russ.)
3. Loane D. J., Stoica B. A., Faden A. I. Neuroprotection for traumatic brain injury. *Handbook of Clinical Neurology*. 2015;127:343–366. DOI: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00022-2.
4. Potapov A. A., Likhterman L. B., Kravchuk A. D., Okhlopkov V. A., Aleksandrova E. V., Filatova M. M., Maryakin A. D., Latyshev Ya. A. *Legkaya cherepno-mozgovaya trauma: klinicheskie rekomendatsii* [Mild traumatic brain injury: Clinical guidelines]. Moscow: Assotsiatsiya neyrokhirurgov Rossii; 2016. 23 p. (In Russ.)
5. Potapov A. A., Krylov V. V., Gavrilov A. G., Kravchuk A. D., Likhterman L. B., Petrikov S. S., Talyarov A. E., Zakharova N. E., Oshorov A. V., Sychev A. A., Aleksandrova E. V., Solodov A. A. Guidelines for the diagnosis and treatment of severe traumatic brain injury. Part 2. Intensive care and neuromonitoring. *Zhurnal "Voprosy neyrokhirurgii" imeni N.N. Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2016;80(1):98–106. (In Russ.) DOI: 10.17116/neiro201680198-10.
6. Tyurenkov I. N., Kurkin D. V., Litvinov A. A., Logvinova E. A., Morkovin E. I., Bakulin D. A., Volotova E. V. Acute stroke models used in preclinical research. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2018;(1):186–197. (In Russ.)
7. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the composition and technology of new neuroprotective drug tablets using fractional factorial design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
8. Chernov N. M., Shutov R. V., Barygin O. I., Dron M. Y., Starova G. L., Kuz'mich N. N., Yakovlev I. P. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type reaction. *European Journal of Organic Chemistry*. 2018;45:6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.
9. Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. Morpholine derivatives as potential agents for neurological manifestations of nervous system diseases. *Formuly Farmatsii = Pharmacy Formulas*. 2020;2(1):16–35. (In Russ.) DOI: 10.17816/phf21381/2713-153X-2020-1-2-16-35.
10. Sysoev Yu. I., Uzuegbunam B. C., Okovityi S. V. Attenuation of neurological deficit by a novel ethanolamine derivative in rats after brain trauma. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2019;11:53–63. DOI: 10.2147/JEP.S199464.
11. Jolkonen J., Puurunen K., Rantaköni S., Häkkinen A., Haapalinna A., Sivenius S. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;400(2–3):211–9. DOI: 10.1016/s0014-2999(00)00409-x.
12. Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*. 1976;83(3):482–504. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
13. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–8. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
14. Schallert T., Fleming S. M., Leisure J. L., Tillerson J. L., Bland S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):777–787. DOI: 10.1016/s0028-3908(00)00005-8.
15. Schallert T., Woodlee M. T., Fleming S. M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury: Recovery of function. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 2002. 201–216 p.
16. Prikhodko V. A., Nikitenko A. A., Petrov D. V., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. *Vliyanie novogo proizvodnogo allylmorfolina na povedenie Danio rerio v teste «Novyy akvarium»*. Aktual'nye problemy i perspektivy farmatsevticheskoy nauki i praktiki: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 40-letiyu farmatsevticheskogo fakul'teta KemGU [Influence of a new derivative of allylmorpholine on the behavior of Danio rerio in the New Aquarium test Actual problems and prospects of pharmaceutical science and practice: materials of the International scientific-practical conference dedicated to the 40th anniversary of the pharmaceutical faculty of the KemSU]. 2019 Nov 29. Kemerovo: KemGU; 2019:416–419. (In Russ.)
17. Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. *Vliyanie novogo proizvodnogo allylmorfolina na povedenie ryb Danio rerio v teste «Novyy akvarium»*. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennoe sostoyanie farmatsevticheskoy otrassli: problemy i perspektivy» [Influence of a new derivative of allylmorpholine on the behavior of Danio rerio fish in the New Aquarium test. Materials of the international scientific and practical conference "The current state of the pharmaceutical industry: problems and prospects"]. 2020 Nov 13. Toshkent. 2020. 392–394 p. (In Russ.)
18. Prikhodko V. A., Kan A. V. *Vliyanie proizvodnykh allylmorfolina na povedenie Danio rerio v teste «Novyy akvarium»*. «Molodaya farmatsiya – potentsial budushchego», XI vserossiyskaya nauchnaya konferentsiya studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiem. Sbornik materialov konferentsii [The effect of allylmorpholine derivatives on the behavior of Danio rerio in the New Aquarium test. "Young Pharmacy – the Potential of the Future", XI All-Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation. Collection of conference materials]. V. 1. March 15 - April 23, 2021. Petersburg: SPKHFU; 2021. 67–68 p. (In Russ.)
19. Sysoev Yu. I., Dagaev S. G., Kubarskaja L. G., Gaikova O. N., Uzuegbunam B. Ch., Modise K., Makwana T. L., Okovityi S. V. Study of the neuroprotective activity of mafedine, an alpha-2 adrenergic receptor agonist, by modeling a traumatic brain injury in rats. *Biomeditsina = Journal Biomed*. 2019;(1):62–77. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
20. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Ilyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sciences*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
21. Saatman K. E., Murai H., Bartus R. T., Smith D. H., Hayward N. J., Perri B. R., McIntosh T. K. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(8):3428–3433. DOI: 10.1073/pnas.93.8.3428.
22. Shi J., Longo F. M., Massa S. M. A small molecule p75(NTR) ligand protects neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cells*. 2013;31(11):2561–74. DOI: 10.1002/stem.1516.
23. Lenci E., Calugi L., Trabocchi A. Occurrence of morpholine in central nervous system drug discovery. *ACS Chemical Neuroscience*. 2021;12(3):378–390. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00729.
24. Kouronakis A. P., Xanthopoulos D., Tzara A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(2):709–752. DOI: 10.1002/med.21634.
25. Tzara A., Xanthopoulos D., Kouronakis A. P. Morpholine as a scaffold in Medicinal Chemistry: An update on synthetic strategies. *ChemMedChem*. 2020;15(5):392–403. DOI: 10.1002/cmdc.201900682.
26. Kumari A., Singh R. K. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:103578. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103578.
27. Washington J., Murcko R. M., Janigro D. Peripheral markers of TBI and blood-brain barrier disruption. In: *Biomarkers for Traumatic Brain Injury*. Cambridge, MA: Academic Press; 2020. 43–54 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-816346-7.00004-X.
28. Bracken M. B. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2009;102(3):120–122. DOI: 10.1258/jrsm.2008.08k033.



Лабораторная диагностика немедикаментозного применения тропикамида

О. Ю. Стрелова^{1*}, Ю. В. Слустовская², А. Н. Гребенюк¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² ADME/Bioanalysis Laboratory, "Selvita S. A.", 30-348, Poland, Krakow, Bobrzynskiego str., 14

*Контактное лицо: Стрелова Ольга Юрьевна. E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

ORCID: О. Ю. Стрелова – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; Ю. В. Слустовская – <https://orcid.org/0000-0002-4856-2745>; А. Н. Гребенюк – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 13.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Описаны многочисленные случаи отравления как при совместном применении с тропикамидом другими наркотическими средствами, так и самостоятельно. Отмечается быстрый рост толерантности к тропикамиду, в основном за счет увеличения кратности введения препарата. С 2015 году препараты, содержащие тропикамид были внесены в перечень лекарственных средств, подлежащих предметно-количественному учету, однако на фармацевтическом рынке России появились комбинированные препараты, представляющие собой сочетание м-холиноблокатора тропикамида с альфа-адреномиметиком фенилэфрином, которые не подпадают под действие этого приказа и, поэтому отпускаются из аптеки без рецепта. С этой целью выявления сроков давности и периодичности употребления перспективным является разработка подходом к обнаружению тропикамида в волосах освидетельствуемых лиц.

Цель. Целью исследования явилась разработка методики изолирования и определения тропикамида в волосах.

Материалы и методы. Исследование проводилось с использованием субстанции тропикамида. Использовали ферменты: папаин, химотрипсин, химопсин. Моделирование накопления тропикамила в волосах (шерсти) проводили на крысах-самцах белого и коричневого природного окраса. Окрашивание шерсти проводили профессиональным красителем Estel Professional De Luxe. Использовали оборудование: аналитические весы Sartorius CP224S; pH-метр FiveEasy; вибрационная шаровая мельница Retsch MM-200. Экстракти из образцов шерсти исследовали методом газовый хроматограф с масс-селективным детектором Agilent Technologies (США) 7890 A/5977 MSD, управление осуществлялось с помощью программы MassHunter GC/MS.

Результаты и обсуждение. В результате гидролиза различными протеазами (химопсин, химотрипсин, папаин) тропикамид был выделен из образцов шерсти в сопоставимых количествах. Проведенное исследование показало, что из пигментированной шерсти выделяется несколько большее количество целевого аналита, даже несмотря на то, что меланин придает волосу химическую устойчивость. Количество тропикамида, извлеченного из шерсти после проведения окрашивания, возросло в среднем на 30 %, на хроматограммах не наблюдались пики продуктов химической деградации тропикамида. Воздействие искусственного красителя на волосы не приводит к разрушению токсиканта, накопленного в волосах и не оказывает негативного влияния на результаты пробоподготовки методикой ферментативного гидролиза. Значение сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости результатов количественного определения тропикамила удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать предлагаемую методику для внедрения в практику.

Заключение. В ходе исследования разработана методика лабораторной диагностики немедикаментозного использования тропикамида, воспроизводимость которой удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать ее для работы в практике лабораторий.

Ключевые слова: тропикамид, волосы, ферментативный гидролиз, протеазы, гиалуронидаза, валидационные параметры

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

Вклад авторов. О. Ю. Стрелова и Ю. В. Слустовская придумали и разработали эксперимент. О. Ю. Стрелова, Ю. В. Слустовская и А. Н. Гребенюк участвовали в обработке данных, написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Стрелова О. Ю., Слустовская Ю. В., Гребенюк А. Н. Лабораторная диагностика немедикаментозного применения тропикамида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):188–196. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-188-196](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-188-196)

Laboratory Diagnosis of the Tropicamide Non-drug Consumption

Olga Yu. Strelova^{1*}, Yulia V. Slustovskaya², Alexander N. Grebenyuk¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² ADME/Bioanalysis Laboratory, "Selvita S. A.", 30-348, Poland

*Corresponding author: Olga Yu. Strelova. E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

ORCID: Olga Yu. Strelova – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; Yulia V. Slustovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4856-2745>;

Alexander N. Grebenyuk – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Received: 20.10.2021

Revised: 13.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Lately, medical services have reported a lot of cases caused by taking Tropicamide alone or with other drugs together. Moreover, it has been declared that the increase in the number of resistance cases to Tropicamide consumption has. Due to those facts, Tropicamide was included in the List of Drugs for Medical Use that should be served by the prescriptions in 2015. However, nowadays in Russia there are many combinations of medicines, for instance, Tropicamide and α -adrenergic agonist (phenylephrine) (Midrimax, Fenikamid, Appamide plus) that are not under that regulation. As a result, those medicines are served in pharmacies without any prescriptions. Thus, method developing for Tropicamide determination in the hair samples to establish his consumption period has become a perspective one.

Aim. The research aimed to develop a method for the isolation and determination of Tropicamide in the hair samples.

Materials and method. Reference standard of Tropicamide was used in this research. The following enzymes – papain, chymopsin, chymotrypsin, and hyaluronidase – were applied in the experiment. To design the long-term consumption of Tropicamide, laboratory animals (Guinea pigs, average masses about 200 – 250 g) with fair and brown nature colour hair were used in this research. The hair of laboratory animals was dyed by professional hair-dye "Estel Professional De Luxe". The following equipment was applied: balance "Sartorius CP224S", pH-meter "FiveEasy", ball mill Retsch MM-200. The hair samples extracts were analyzed by gas chromatography with mass selective detection (Gas chromatograph model 7890A with mass selective detector model 5977 and MassHunter GC/MS software by Agilent Technologies).

Results and discussion. All developed methods of enzymatic hydrolysis (by papain, chymopsin, chymotrypsin, and hyaluronidase) revealed comparable results for the Tropicamide determination in the hair samples. The research showed that the amount of the analyte isolated from the pigmented hair was a bit higher in comparison with the other hair samples (fair hair), despite the melanin gives chemical steadiness property to hair stuff. Moreover, the amount of Tropicamide extracted from the dyed hair samples increased by 30 %. The degradation products of the analyte of interest were not found in the extracts obtained for the dyed hair samples. Thus, the colorant does not destroy the xenobiotic during the hair dying procedure and does not impact the enzymatic hydrolysis process. The values of the validation parameters (precision and accuracy) met the required criteria for bioanalytical methods. Therefore, the enzymatic hydrolysis method can be recommended for application in laboratory practice.

Conclusion. In the course of the study, a method for laboratory diagnostics of non-drug use of tropicamide was developed, the reproducibility of which meets the acceptance criteria for bioanalytical methods, which makes it possible to recommend it for work in laboratory practice.

Keywords: tropicamide, hair, enzymatic hydrolysis, proteases, hyaluronidase, 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. Olga Yu. Strelava and Yulia V. Slustovskaya invented and developed an experiment. Olga Yu. Strelava, Yulia V. Slustovskaya and Alexander N. Grebenyuk participated in data processing, writing the text of the article and discussing the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Strelava O. Yu., Slustovskaya Yu. V., Grebenyuk A. N. Laboratory diagnosis of the Tropicamide non-drug consumption. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv=Drug development®istration.* 2021;10(4-1):188–196. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-188-196](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-188-196)

ВВЕДЕНИЕ

В последние 10 лет резко возросло злоупотребление лекарственными средствами из группы холиноблокаторов: циклопентолатом (цикломед) и тропикамидом, которые применяются в офтальмологии в виде капель для расширения зрачка. Тропикамид по фармакологическому действию относится к М-холиноблокаторам и является диагностическим препаратом для местного применения в офтальмологии [1, 2]. Люди, страдающие наркозависимостью, вводят данное соединение в организм перорально или внутривенно для достижения одурманивающего эффекта или для усиления состояния эйфории, обусловленное последующим приемом опиатов и опиоидов. Описаны многочисленные случаи отравления различной степени тяжести как при совместном применении с тропикамидом другими наркотическими средствами, так и самостоятельно [1, 3–9].

Отмечается быстрый рост толерантности к тропикамиду, в основном за счет увеличения кратности введения препарата. При сочетанном употреблении

тропикамида с героином действие последнего усиливалось. Препараты, содержащие тропикамид вызывают сильнейшее привыкание и невероятную психическую зависимость, регулярные инъекции приводят к тяжелым последствиям в очень короткие сроки. Зависимость и последствия использования тропикамида во много раз сильнее героина [1–9].

Тропикамид – относительно новый объект химико-токсикологических и судебно-химических исследований. Ряд авторов предлагают методики его обнаружения в биологических объектах (кровь, моча, внутренние органы). Из биологических жидкостей (моча) наибольшее количество тропикамида извлекается при pH 7,0 – 8,0 после предварительного кислотного гидролиза [3, 4, 10–14]. Для идентификации тропикамида в извлечениях возможно использование метода газовой хроматографии с применением дериватизации BSTFA и хромато-масс-спектрометрии [3, 14, 15].

В связи ростом количества интоксикаций при не-медикаментозном применении глазных капель тропикамида, в 2015 году данная лекарственная форма,

содержащая тропикамид, была внесены в перечень лекарственных средств для медицинского применения, подлежащих предметно-количественному учету. Несмотря на это данный препарат не потерял своей актуальности среди подростков в возрасте от 14 до 19 лет. На фармацевтическом рынке России появились комбинированные препараты (Мидримакс, Феникамид, Аппамид Плюс), представляющие собой сочетание м-холиноблокатора тропикамида с альфа-адреномиметиком фенилэфрином, которые не подпадают под действие этого приказа и поэтому отпускаются из аптеки без рецепта [1].

Поскольку в медицине тропикамид рекомендован к применению как местное, диагностическое лекарственное средство, в литературе отсутствуют сведения о фармакокинетических показателях данного вещества, таких как объем распределения, период полувыведения [15]. Этот затрудняет возможность проведения лабораторной диагностики при немедикаментозном применении тропикамида, особенно выявления сроков давности и периодичности употребления. С этой целью перспективным является разработка подходом к обнаружению тропикамида в волосах освидетельствуемых лиц [9, 16, 17].

Целью исследования явилась разработка методики изолирования и определения тропикамида в волосах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с использованием субстанции тропикамида по НД ФС 001723-211217. Для проведения гидролиза использовали ферменты: папаин (ЗАО «Вектон»), химотрипсин, химопсин, субстанция трилона Б (чда), субстанция цистеина. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Моделирование накопления тропикамила в волосах (шерсти) выполняли на лабораторных животных, крыс-самцов белого и коричневого природного окраса возрастом около 6 месяцев и массой 200–250 г. Содержание лабораторных животных в экспериментально-биологической клинике (виварии) центра клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ осуществлялось согласно требованиям международной системы правил и требований к лабораториям, которые занимаются изучением воздействия новых химических соединений на окружающую среду и здоровье человека (Good Laboratory Practice, GLP) [18–21].

Лабораторным животным в течение 28 дней в хвостовую вену вводили раствор тропикамида с концентрацией 40 мг/кг. Через 28 дней эксперимента состригали шерсть со спины и боков туловища животного. Образца шерсти подвергли деконтамина-

ции: в стеклянном стакане заливали водой очищенной до покрытия частиц биообъекта (в объеме примерно 9–10 мл), в течение 10 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании промывали от внешних загрязнений. Затем процедуру повторяли, используя метанол. Шерсть измельчали ножницами до размера 3–5 мм, затем в шаровой мельнице до консистенции пудры.

Окрашивание шерсти проводили профессиональным красителем оксигент 6 % Estel Professional De Luxe, обесцвечивающей пудрой для волос Estel Princess Essex Bleaching Power и крем-краской для волос ESTEL PROFESSIONAL 10/45 DELUXE [21]. Шерсть животного окрашивали непосредственно перед забором шерсти через 28 дней после начала эксперимента по накоплению лекарственного вещества.

Эксперимент проводился с использованием оборудования: аналитические весы Sartorius CP224S; pH-метр FiveEasy; вибрационная шаровая мельница Retsch MM-200. Экстракти из образцов шерсти исследовали методом газовый хроматограф с масс-спектротипным детектором Agilent Technologies (США) 7890 A/5977 MSD, управление осуществлялось с помощью программы MassHunter GC/MS, обработка полученных данных проводилась в программах Chemstation Data Analysis, AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System), MassHunter Quantitative Analysis (США). Идентификацию пиков проводили с помощью библиотек NIST MS Search 2.2, Pmw_TOX3.1.

Количественное определение тропикамила в экстрактах из шерсти проводили по градуировочному графику. Градуировочный график имеют линейную зависимость в диапазоне концентраций (10–200 мкг/мл), $0,99 \leq R \leq 1,0$. Были установлено, что относительное стандартное отклонение (RSD%) сходимости результатов количественного определения не превышает 2 %, относительное стандартное отклонение прецизионности не превышает 2 %, открытоесть (Recovery, %) находится в диапазоне 99,5–100,5 %, что соответствует критерию приемлемости [16, 28–34].

Гидролиз протеазами образцов шерсти проводили по методике [22–27]: точную навеску около 400 мг порошка шерсти помещали в коническую пробирку, добавить 4 мл фосфатного буфера, содержащего фермент (химопсин или химотрипсин) или 4 мл раствора папаина в концентрации 0,5 мг/мл в ацетатном буферном растворе, содержащим 0,1 % раствора трилона Б и 0,1 % раствора цистеина, плотно укупорить и термостатировать при 37 °C 3 ч. Затем пробу центрифугировали при 4600 об/мин в течение 10 мин и отбирали центрифугат. К осадку добавляли вторую порцию раствора фермента в равном объеме (4 мл), перемешали и термостатировали следующие 3 ч при 37 °C. Полученную пробу вновь центрифугировали

при 4600 об/мин в течение 10 мин, отбирали центрифугат. Общее время гидролиза составляет 6 ч. Из объединенного гидролизата проводили экстракцию при pH = 9–10, экстрагировали 3 порциями хлороформа по 2 мл. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл комплексного растворителя и анализировали методом ГХ–МС: неполярная капиллярная колонка HP-5ms [30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм]; газ–носитель гелий [марки «А» (99,995 %)]; скорость потока 0,8 мл/мин в режиме «постоянный поток» (constant flow); температура инжектора 260 °C; температура интерфейса 290 °C. Температура колонки программируемая: начальная 80 °C с выдержкой 1,2 мин, нагрев до 100 °C со скоростью 50 °C/мин, нагрев до 310 °C со скоростью 20 °C/мин и выдержкой 5 мин. Температура ионного источника 230 °C, температура квадруполя MSD 150 °C, энергия ионизации 70 эВ, сбор данных в режиме сканирования (SCAN), интервал масс 44–450 а.е. В инжектор хроматографа автоматически вводили 1 мкл пробы (splitless).

Кислотный гидролиз: к точной навеске порошка шерсти около 400 мг в стеклянной тубе на 10 мл добавляли 4 мл 6 М раствора хлористоводородной кислоты, плотно укупоривали, перемешивали и термостатировали при 37 °C 12 ч. Из гидролизата проводили экстракцию, по методике, представленной выше [23].

Щелочной гидролиз: к точной навеске порошка шерсти около 400 мг в стеклянной тубе на 10 мл добавили 4 мл 2М раствора калия гидроксида, термостатировали при 37 °C 12 ч. Из гидролизата проводили экстракцию, по методике, представленной выше [23].

Полученные в ходе экспериментов данные обрабатывали методами математической статистики в соответствии с рекомендациями Государственной Фармакопеи РФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [34] с помощью программы «Microsoft Excel 2010». Рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение показателей в каждой исследуемой группе. Статистическую значимость различий полученных данных оценивали с вероятностью $p < 0.1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ткани волос токсиканты находятся в связанном с белками виде. Поэтому данный объект требует серьезной пробоподготовки, которая с одной стороны приведет к выделению целевого аналита из связи с белками волоса, а с другой не будет приводить к его разрушению. Очень хорошо зарекомендовала себя в этом плане методика гидролиза неспецифическими протеазами животного и растительного происхождения [22–26].

Эксперимент по накоплению исследуемых веществ в волосах (шерсти) проводили на лабораторных животных двух природных окрасов: белой (альбиносах), в шерсти которых не содержится природного пигмента меланина и коричневой, содержащей преимущественно эумеланин. Таким образом, мы получили возможность установить влияние наличия меланина и его модификаций на накопление токсикантов в волосах (шерсти) [21]. Также выявить возможные негативные влияния на пробоподготовку данного объекта химического воздействия в виде процедуры окрашивания.

В качестве методик сравнения использовали кислотный и щелочной гидролиз, наиболее часто применяемые в практике работе профильных лабораторий.

На хроматограммах экстрактов из образцов шерсти (рисунок 1) имеется пик со временем удерживания около 12 мин и соответствующий ему масс-спектр, идентифицированный по базе данных прибора как тропикамид с вероятностью совпадения не менее 90 %. Пик обладает достаточной интенсивностью, спектрограммы высокого разрешения и не требуют дополнительного вычитания фона как для идентификации, так и для количественного определения. На хроматограмме отмечались пики эндогенных веществ, аналогичные пикам веществ, идентифицированных на хроматограммах проб шерсти контрольных животных, представленные преимущественно эфирами высших жирных кислот и холестерином [21]. На полученных хроматограммах не были обнаружены основные метаболиты тропикамида: N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид, N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид и N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамид [10].

В результате ферментативного гидролиза различными протеазами (таблица 1) тропикамид был выделен из образцов шерсти в сопоставимых количествах. Проведенное исследование показало, что из пигментированной шерсти выделяется несколько большее количество целевого аналита, даже несмотря на то, что меланин придают волосу химическую стабильность [34].

Данные о влиянии химического воздействия на результаты изолирования и последующего обнаружения лекарственных веществ в волосах противоречивы [34]. Ряд авторов утверждает, что при проведении процедуры окрашивания (обесцвечивания и окрашивания в другой цвет) возможна химическая деградация токсиканта. Свои выводы они базируют на эксперименте, проведенном *in vitro*, когда воздействию красителя подвергался образец темно-русых волос с добавлением в трис-буферном растворе (трис(гидроксиметил)аминометан) физиологические растворы натрия хлорида с pH 7.4) морфина, кодеина, дигидрокодеин, либо смесь двух из этих веществ. Было уста-

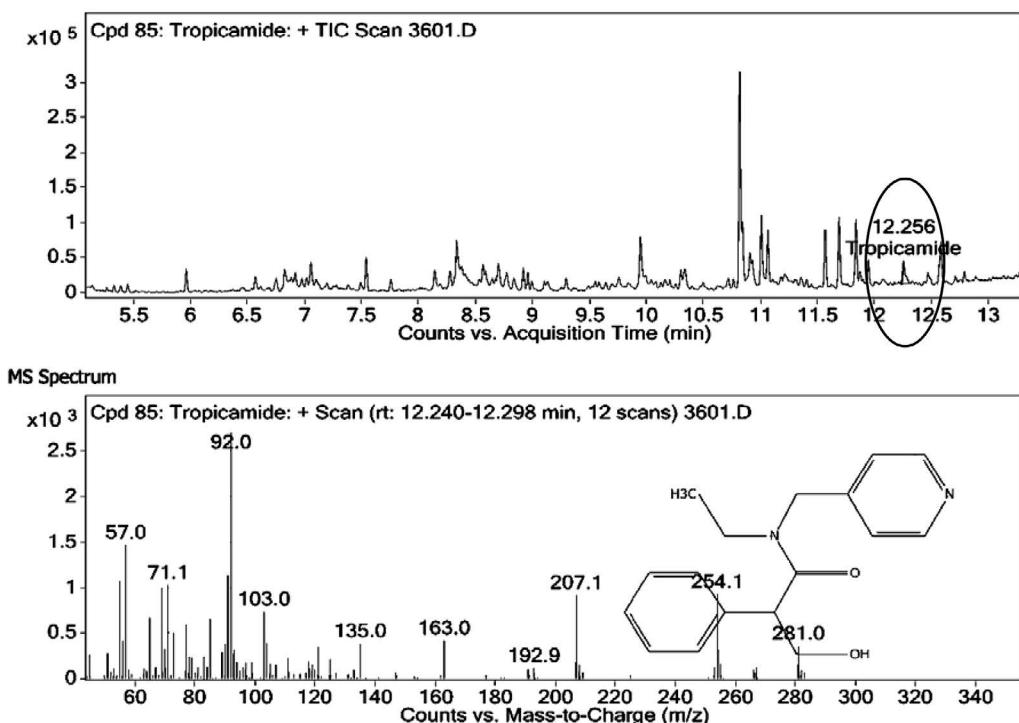


Рисунок 1. Хроматограмма и масс-спектр экстрактов из образцов шерсти, содержащих тропикамид после гидролиза папаином
Figure 1. Chromatogram and mass spectrum of Tropicamide in extracts from hair samples after hydrolysis by papain

новлено, что от 2 % до 18 % исходного содержания опиатов может быть обнаружено после обесцвечивания и около 20–30 % лекарственного вещества можно обнаружить после химической завивки [34]. Проведенный нами эксперимент заключался в том, что краситель воздействовал на волос (шерсти), пигмент волоса, а токсикант находящийся в связанном с белками волос виде.

На хроматограммах экстрактов из образцов шерсти (рисунок 2) имеется пик со временем удерживания около 11 мин и соответствующий ему масс-

спектр, идентифицированный по базе данных прибора как тропикамид с вероятность совпадения не менее 90 %.

Количество тропикамида, извлеченного из шерсти после проведения окрашивания, возросло в среднем на 30 %, на хроматограммах не наблюдались пики продуктов химической деградации тропикамида.

Анализируя данные проведенных экспериментов по влиянию процедуры окрашивания на результаты изолирования методикой ферментативного гидролиза, можно отметить, что наблюдается тенденция к уве-

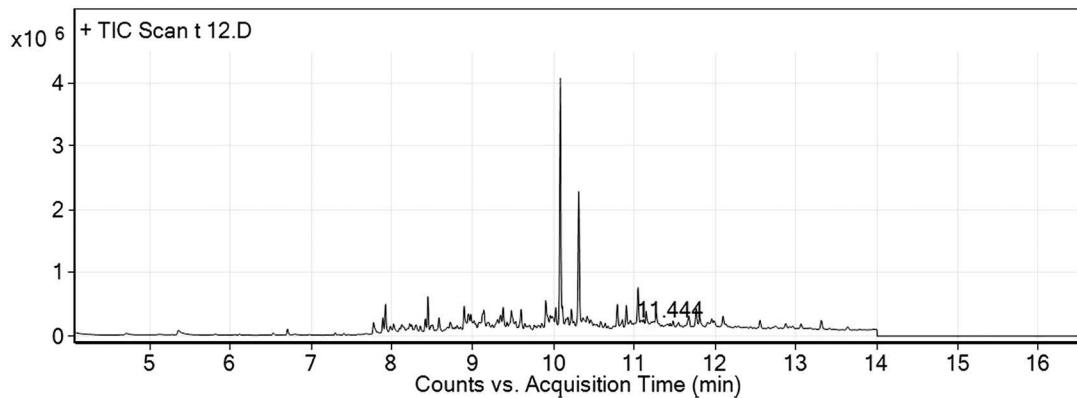


Рисунок 2. Хроматограмма экстракта из образцов коричневой обесцвеченной шерсти, содержащей тропикамид после гидролиза папаином

Figure 2. Chromatogram of Tropicamide in the extract from dyed brown hair samples after hydrolysis by papain

личению степени экстракции токсиканта. Связано это с тем, что под действием щелочной среды ($\text{pH} = 11.75$) красителя поверхность волоса становится открытой и доступной для действия фермента. Таким образом, воздействие искусственного красителя на волосы не приводит к разрушению токсиканта, накопленного в волосе и не оказывает негативного влияния на результаты пробоподготовки методикой ферментативного гидролиза. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее на образцах шерсти, содержащих фенобарбитал и дифенгидрамин [21].

Таблица 1. Результаты статистической обработки данных количественного определения тропикамида в экстрактах из образцов шерсти

Table 1. Statistical processing of results for the Tropicamide determination in hair samples extracts

Окраска шерсти / вид гидролиза Colour hair / hydrolysis	Метрологические характеристики результатов количественного определения (нг/мг) Metrological characteristics of quantification results (ng/mg)			
	нг/мг	S	ϵ %	RSD %
Кислотный Acidic				
Белая White	7.360.18	0.23	5.23	3.13
Коричневая Brown	8.070.77	0,11	1.36	1.04
Щелочной Alcaline				
Белая White	13.031,05	1.29	9.46	9.38
Коричневая Brown	16.170.25	0.33	1.06	2.04
Ферментативный / папаин Enzymatic / papain				
Белая White	14,60 \pm 0,22	0.21	1.53	1.46
Коричневая Brown	17,28 \pm 0,51	0.73	1.64	4.26
Ферментативный / химопсин Enzymatic / chymopsin				
Белая White	13,93 \pm 1,69	0.66	4.95	4.72
Коричневая Brown	16,65 \pm 0,24	0.51	0.02	3.09
Ферментативный / химотрипсин Enzymatic / chymotrypsin				
Белая White	13,08 \pm 0,71	0.68	13.32	5.18
Коричневая Brown	15,93 \pm 0,86	1.58	9.93	0.19

Таблица 2. Результаты статистической обработки данных количественного содержания тропикамида в экстрактах из образцов шерсти после процедуры окрашивания

Table 2. Statistical processing of results for the Tropicamide determination in dyeing hair samples extracts

Вид гидролиза / фермента Hydrolysis / enzymatic	Метрологические характеристики результатов количественного определения (нг/мг) Metrological characteristics of quantification results (ng/mg)			
	нг/мг	S	ϵ %	RSD %
Белая шерсть, окрашенная в черный White hair dyed black				
Папаин Papain	19.60 \pm 0,87	0.43	4.42	2.19
Обесцвеченная рыжая шерсть Discolored redhead hair				
Папаин Papain	23.75 \pm 1.33	1.66	1.04	7.0

Для предлагаемой методики ферментативного гидролиза определены значения сходимости (повторяемости), относительное стандартное отклонение которого (RSD %) не превышало 3 %, и внутrilабораторной (промежуточной) воспроизводимости результатов количественного определения (RSD % не превышало 5 %), что соответствует критерию приемлемости в 15 %, рекомендуемых для биоаналитических исследований [16, 28–33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было показано, что методика ферментативного гидролиза протеазами низкой специфичности может быть рекомендована для проведения пробоподготовки волос при диагностике немедикаментозного применения лекарственных средств, содержащих тропикамид.

Показано, что воздействие искусственного красителя на волосы не приводит к разрушению токсиканта, накопленного в волосах и не оказывает негативного влияния на результаты пробоподготовки методикой ферментативного гидролиза.

Значение валидационных параметров сходимости и внутrilабораторной воспроизводимости удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать предлагаемую методику для работы в практике лабораторий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России. Справочник по лекарственным препаратам и их производителям. Доступно по: <http://www.rlsnet.ru>. Ссылка активна на 05.09.2021.
2. Банникова Г. А., Мелентьев А. Б., Лаврентьева А. В. Определение тропикамида в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Проблемы экспертизы в медицине*. 2011;1-2:16–18.

3. Бушуев Е. С., Горбачева Т. В., Бычков В. А. Тропикамид как объект химико-токсикологического анализа. СПб.: СПб ГБУЗ «БСМЭ»; 2013. 32 с.
4. Рейхарт Д. В., Чистяков В. В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. Казанский медицинский журнал. 2010;4:532–536.
5. Рохлина М. Л., Богинская Д. Д., Усманова Н. Н., Мохнатчев С. О. Злоупотребление производными лекарственных препаратов. Журнал неврологии и психиатрии. 2013;7:55–59.
6. Калёкин Р. А., Салтыкова О. В., Родионова Г. М., Гегечкори В. И., Орлова А. М. Изучение прегабалина и лоразепама при совместном присутствии для целей химико-токсикологического исследования. Судебно-медицинская экспертиза. 2020;63(1):36–41. DOI: 10.17116/sudmed20206301136.
7. Калёкин Р. А., Орлова А. М., Савчук С. А., Барсегян С. С. Изучение фенспирида для целей и задач химико-токсикологического исследования. Судебно-медицинская экспертиза. 2019;62(4):37–41. DOI: 10.17116/sudmed20196204137.
8. Лаврентьева А. В., Банникова Г. А., Мелентьев А. Б. Определение тропикамида в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. Проблемы экспертизы в медицине. 2011;12:16–18.
9. Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю. Волосы как объект химико-токсикологического анализа. Токсикологический вестник. 2015;5(134):13–19.
10. Панова Е. П., Владимира О. В., Куриленко М. И., Дряглина Л. П. Судебно-химическое определение тропикамида. Судебно-медицинский журнал. Доступно по: <http://journal.forens-lit.ru/node/666>. Ссылка активна на 05.09.2021.
11. Мансуров Р. Г., Артемьева И. А., Попкова В. В., Хабиева Н. А. Изолирование, идентификация, количественное определение тропикамида. Судебно-медицинский журнал. Доступно по: <http://journal.forens-lit.ru/node/340>. Ссылка активна на 05.09.2021.
12. Федосеева Л. М., Даутова Д. Д., Кнауб Н. Н., Воронкова Л. Г., Кодрян В. А. Химико-токсикологическое исследование тропикамида. Судебно-медицинский журнал. Доступно на: <http://journal.forens-lit.ru/node/491>. Ссылка активна на 05.09.2021.
13. Шорманов В. К., Правдюк М. Ф., Чекед М. В., Баранникова В. В. Распределение тропикамида в организме теплокровных животных при внутрижелудочном введении. Судебно-медицинская экспертиза. 2016;2(59):27–34. DOI: 10.17116/sudmed201659227-34.
14. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. Clarke's analysis of drug and poisons. London: The Pharmaceutical press; 2011. 2609 р.
15. Приказ Минздрава России от 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» (Зарегистрировано в Минюсте России 11.03.2016 № 41390). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274. Ссылка активна на 05.09.2021.
16. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 27.01.2006 N 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ». Доступно на: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_58773/. Ссылка активна на 05.09.2021.
17. ГОСТ 53434-2009. Принципы лабораторной практики GLP. М: Стандартинформ; 2010:12 с.
18. Приказ Минздрава ЗО РФ от 26.05.2003 г. № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного стандарта качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Доступно на: <http://zakonbase.ru/content/part/371728>. Ссылка активна на 05.09.2021.
19. Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»: постановление главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51. Российская газета (специальный выпуск). 2015. 24 с.
20. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C: The National Academies press; 2010. 218 р.
21. Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Крысько М. В., Куклин В. Н. Исследование волос с целью диагностики употребления психоактивных веществ. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2019;1:120-126.
22. Крысько М. В., Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Куклин В. Н. Обнаружение фенобарбитала и дифенгидрамина в волосах после косметического воздействия. Биомедицинский журнал Medline.ru Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии». 2019;170–174.
23. Слустовская Ю. В., Крысько М. В., Стрелова О. Ю. Разработка методики ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из образцов волос. Судебно-медицинская экспертиза. 2017;2(60):36–40. DOI: 10.17116/sudmed201760236-40.
24. Крысько М. В., Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Куклин В. Н. Разработка и валидация методики ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из неокрашенных волос. Судебно-медицинская экспертиза. 2019;1:24–29. DOI: 10.17116/sudmed20196201124.
25. Старовойтова М. К., Миначенкова А. С., Крысько М. В., Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Куклин В. Н. Сравнительная характеристика методик ферментативного гидролиза для изолирования токсичных веществ из цельной крови и волос. Судебно-медицинская экспертиза. 2020;3(63):23–29. DOI: 10.17116/sudmed20206303123.
26. Уварова Н. Е., Ерёменко Н. Н., Раменская Г. В., Горячев Д. В., Смирнов В. В. Современные регуляторные требования FDA к валидации биоаналитических методик в сравнении с требованиями ЕАЭС. Химико-фармацевтический журнал. 2019;8(53):45–52. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-8-45-52.
27. Барсегян С. С., Саломатин Е. М., Плетнева Т. В., Максимова Т. В., Долинкин А. О. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. М.: ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России; 2014. 74 с.
28. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(1):99–108. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108.
29. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики количественного определения валганцикливира и его метаболита ганцикливира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(2):133–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139.
30. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В. Определение валганцикливира и ганцикливира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(1):120-128. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128.
31. Комаров Т. Н. Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Садчикова Н. П. Разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;4(9):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154.

32. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 28.10.2021.
33. Бриттон Г. Биохимия природных полимеров. М.: Мир; 1986. 422 с.
34. Pötsch L., Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Science International*. 1996;81: 95–102.
35. Larsson B., Tjulve H. Studies on the mechanism of drug binding to melanin. *Biochemical Pharmacology*. 1978;28:1181–1187.

REFERENCES

1. *Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. Spravochnik po lekarstvennym preparatam i ikh proizvoditelyam* [Register of medicines of Russia. Directory of medicines and their manufacturers]. Available at: <http://www.rlsnet.ru>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
2. Bannikova G. A., Melent'ev A. B., Lavrent'eva A. V. Determination of tropicamide in blood by gas chromatography with a mass-selective detector. *Problemy ekspertizy v meditsine = Problems of expertise in medicine*. 2011;1–2:16–18. (In Russ.)
3. Bushuev E. S., Gorbacheva T. V., Bychkov V. A. *Tropikamid kak ob'ekt khimiko-toksikologicheskogo analiza* [Tropicamide as an object of chemical and toxicological analysis]. St. Petersburg: SPb GBUZ "BSME". 2013. 32 p. (In Russ.)
4. Reikhart D. V., Chistyakov V. V. Analysis of drugs in pharmacokinetic studies. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2010;4:532–536. (In Russ.)
5. Rokhлина М. Л., Boginskaya D. D., Usmanova N. N., Mokhnachev S. O. Abuse of drug derivatives. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*. 2011;12:16–18. (In Russ.)
6. Kalekin R. A., Saltykova O. V., Rodionova G. M., Gegechkori V. I., Orlova A. M. On the issue of the detection of pregabalin and lorazepam in the cases of their joint presence for the purpose of chemical toxicological studies. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa = Forensic Medical Expertise*. 2020;63(1):36–41. DOI: 10.17116/sudmed20206301136. (In Russ.)
7. Kalekin R. A., Orlova A. M., Savchuk S. A., Barsegian S. S. The study of fenspiride: goals and objectives for chemical and toxicological studies. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa = Forensic Medical Expertise*. 2019;62(4):37–41. DOI: 10.17116/sudmed20196204137. (In Russ.)
8. Lavrent'eva A. B., Bannikova G. A., Melent'ev A. B. Determination of tropicamide in blood by gas chromatography with a mass-selective detector. *Problems of expertise in medicine*. 2011;12:16–18. (In Russ.)
9. Slustovskaya Yu. V., Strelava O. Yu. Hair as an object of chemical and toxicological analysis. *Toksikologicheskiy vestnik = Toxicological Bulletin*. 2015;5(134):13–19. (In Russ.)
10. Panova E. P., Vladimirova O. V., Kurilenko M. I., Dryaglina L. P. *Sudebno-khimicheskoe opredelenie tropikamida* [Forensic-chemical definition of tropicamide]. *Sudebno-meditsinskii zhurnal = Forensic Journal*. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/666>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
11. Mansurov R. G., Artem'eva I. A., Popkova V. V., Khabieva N. A. *Izolirovanie, identifikatsiya, kolichestvennoe opredelenie tropikamida* [Isolation, identification, quantitative determination of tropicamide]. *Sudebno-meditsinskii zhurnal = Forensic Journal*. Available at: <http://journal.forens-lit.ru>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
12. Fedoseeva L. M., Dautova D. D., Knaub N. N., Voronkova L. G., Kodryan V. A. *Khimiko-toksikologicheskoe issledovanie tropikamida* [Chemical-toxicological study of tropicamide]. *Sudebno-meditsinskii zhurnal = Forensic Journal*. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/491>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
13. Shormanov V. K., Pravdyuk M. F., Cheked M. V., Barannikova V. V. Distribution of tropicamide in the body of warm-blooded animals with intragastric administration. *Sudebno-Meditsinskaya ekspertiza = Forensic-medical examination*. 2016;59(2):27–34. DOI: 10.17116/sudmed201659227–34. (In Russ.)
14. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. Clarke's analysis of drug and poisons. London: The Pharmaceutical press; 2011. 2609 p.
15. *Prikaz Minzdrava Rossii ot 18.12.2015 № 933n (red. ot 25.03.2019) «O poryadke provedeniya meditsinskogo osvidetel'stovaniya na sostoyanie op'yaneniya (alkogol'nogo, narkoticheskogo ili inogo toksicheskogo)» (Zaregistrirовано в Министерстве здравоохранения Российской Федерации 11.03.2016 № 41390) [Order of the Ministry of Health of Russia of 12.18.2015 № 933n (as amended of 03.25.2019) "On the procedure for conducting a medical examination for the state of intoxication (alcoholic, narcotic or other toxic)" (Registered in the Ministry of Justice of Russia 03.11.2016 N 41390)]. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)*
16. *Prikaz Minzdravssotsrazvitiya RF ot 27.01.2006 N 40 «Ob organizsii provedeniya khimiko-toksikologicheskikh issledovanii pri analiticheskoy diagnostike nalichiya v organizme cheloveka alkogolya, narkoticheskikh sredstv, psikhotropnykh i drugikh toksicheskikh veshchestv»* [Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of January 27, 2006 N 40 "On the organization of chemical and toxicological studies in the analytical diagnosis of the presence in the human body of alcohol, narcotic drugs, psychotropic and other toxic substances". Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_58773. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
17. *GOST 53434-2009. Printsipy laboratornoy praktiki GLP* [GOST 53434-2009. GLP Laboratory Practice Principles]. Moscow: Standartinform. 2010. 12 p. (In Russ.)
18. *Prikaz Minzdrava ZO RF ot 26.05.2003 g. № 220 «Ob utverzhdenii otrazhlevogo standarta «Pravila provedeniya vnutrilaboratornogo standarta kachestva kolichestvennykh metodov klinicheskikh laboratornykh issledovanii s ispol'zovaniem kontrol'nykh materialov»* [On the approval of the industry standard "Rules for conducting an intralaboratory quality standard for quantitative methods of clinical laboratory research using control materials" order of the Ministry of Health of the Russian Federation May 26, 2003 No. 220]. Available at: <http://zakonbase.ru/content/part/371728>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
19. *Ob utverzhdenii SP 2.2.1.3218-14 «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustroystvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental'no-biologicheskikh klinik (vivariev): postanovlenie glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 29.08.2014 № 51* [On the approval of SP 2.2.1.3218-14 "Sanitary and Epidemiological Requirements for the Design, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivariums)": Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of August 29, 2014 No. 51. *Rossiyskaya Gazeta = Russian Magazine (special issue)*. 2015. 24. (In Russ.)
20. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: The National Academies press. 2010. 218 p.
21. Slustovskaya Yu. V., Strelava O. Yu., Krysko M. V., Kuklin V. N. Hair research for the purpose of diagnosing the use of psychoactive substances. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019;1:120–126. (In Russ.)
22. Krysko M. V., Slustovskaya Yu. V., Strelava O. Yu., Kuklin V. N. Detection of phenobarbital and diphenhydramine in hair after cosmetic treatment. *Biomeditsinskii zhurnal Medline.ru. Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii = Biomedical journal Medline.ru. Materials of the scientific-practical conference "Actual issues of toxicology and pharmacology"*. 2019;170–174. (In Russ.)
23. Slustovskaya Yu. V., Krysko M. V., Strelava O. Yu. The development of the method for enzymatic hydrolysis for the extraction of toxic substances from the hair samples. *Sudebno-Meditsinskaya*

- Ekspertisa = Forensic-medical examination.* 2017;60(2):36–40. DOI: 10.17116/sudmed201760236-40. (In Russ.)
24. Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu., Kuklin V. N. The development and validation of the methods for enzymatic hydrolysis for the extraction of toxic compounds from the uncoloured hairs. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa = Forensic-medical examination.* 2019;62(1):24–30. DOI: 10.17116/sudmed20196201124. (In Russ.)
25. Starovoitova M. K., Minachenkova A. S., Krysko M. V., Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu., Kuklin V. N. Comparative characteristics of enzymatic hydrolysis techniques for isolating toxic substances from whole blood and hair. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza = Forensic-medical examination.* 2020;63(3):23–29. DOI: 10.17116/sudmed20206303123. (In Russ.)
26. Uvarova N. E., Eremenko N. N., Ramenskaya G. V., Goryachev D. V., Smirnov V. V. The FDA requirements for bioanalytical method validation. *Himiko-farmacevticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2019;8(53):45–52. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-8-45-52. (In Russ.)
27. Barsegyan S. S., Salomatin E. M., Pletneva T. V., Maksimova T. V., Dolinkin A. O. *Metodicheskie rekomendatsii po validatsii analiticheskikh metodik, ispol'zuemykh v sudebno-khimicheskem i khimiko-toksikologicheskem analize biologicheskogo materiala* [Guidelines for the validation of analytical methods used in forensic chemical and chemical toxicological analysis of biological material]. Moscow: FGBU "RCSME" of the Ministry of Health of Russia. 2014. 74 p. (In Russ.)
28. Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and Validation of Atazanavir and Ritonavir Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(1):99–108. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108. (In Russ.)
29. Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and validation of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir determination in human plasma by HPLC-UV Method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(2):133–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133–139. (In Russ.)
30. Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(4):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-146–154. (In Russ.)
31. Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(4):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-146–154. (In Russ.)
32. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopeia.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
33. Britton G. *Biokhimiya prirodnnykh polimerov* [Biochemistry of natural polymers]. Moscow: Mir. 1986. 422 p. (In Russ.)
34. Pötsch L., Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Science International.* 1996;81: 95–102.
35. Larsson B., Tjulve H. Studies on the mechanism of drug binding to melanin. *Biochemical Pharmacology.* 1978;28:1181–1187.



Оценка влияния минерального комплекса рутина на степень выраженности противодиабетической активности

В. И. Топоркова*, Е. В. Вишняков, К. О. Сидоров, И. И. Тернинко, Д. Ю. Ивкин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Топоркова Валерия Игоревна. E-mail: toporkova.valeriya@pharminnotech.com

ORCID: В. И. Топоркова – <https://orcid.org/0000-0002-5985-5156>; Е. В. Вишняков – [0000-0002-4716-7866](https://orcid.org/0000-0002-4716-7866); К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>;
И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 16.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Сахарный диабет 2 типа на сегодняшний день считается одним из самых распространенных неинфекционных заболеваний. Для профилактики и сопутствующего лечения данной патологии с успехом применяются различные фитопрепараты, такие как, например, побеги черники обыкновенной. Растение содержит фенольные соединения (антоцианы, флавоноиды, фенолкарбоновые и органические кислоты), которые обладают антиоксидантным и гипогликемическим эффектами, а также накапливает макро- и микроэлементы (Са, Mg, Zn, Mn), в свою очередь способные влиять на течение сахарного диабета. Комплексы элементов с БАВ фенольного характера могут влиять на формирование фармакологического ответа или изменять его степень выраженности. Следовательно, можно выдвинуть гипотезу о потенцировании противодиабетического действия фенольных соединений при их существовании в виде минеральных комплексов.

Цель. Провести сравнительную оценку противодиабетической активности минерального комплекса рутина с цинком в сравнении с веществами предшественниками и извлечением из побегов черники для прогнозирования влияния элементов на течение данной патологии.

Материалы и методы. Объектами исследования были водный раствор ($C = 0,18$ мг/мл) модельного комплекса рутина с цинком с соотношением числа моль компонентов 1:1 и побеги черники обыкновенной, приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга. По информации на упаковке регион заготовки сырья – Алтайский край, г. Барнаул, период заготовки черники – июль 2020 года. Комплекс рутина с цинком получали по методике, приведенной в литературе из фармацевтической субстанции рутина (Rutin, партия 332, годен до 26.03.2023, Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., Китай, ФС 000569-060514) и водного раствора ($C = 0,13$ мг/мл) цинка хлорида (Цинк хлористый б/в, партия 39/G 4, годен до 09.10.2021, Нева Реактив, Россия, СТП ТУ КОМП 1-533-2012). Оптимальное соотношение компонентов 1:1 для формирования минерального комплекса, установлено нами ранее экспериментально с применением метода Джоба. Массу цинка хлорида, которую необходимо добавить к извлечению, и массу комплекса для приготовления его водного раствора рассчитывали на основании количественного содержания БАВ в побегах черники и определенного спектральным методом мольного соотношения компонентов, участвующих в образовании комплексного соединения. Количественное содержание основных групп БАВ (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, органические кислоты) определяли спектрофотометрически на приборе СФ-2000 (Россия) и титриметрически с использованием методик, представленных в ГФ XIV ФС.2.5.0093.18 и ФС.2.5.0012.15. Противодиабетическое действие комплекса рутина с цинком оценивали в сравнении с водным извлечением из побегов черники обыкновенной (соотношение сырье:экстрагент – 1:80), водным раствором цинка хлорида (концентрация – 0,36 мг/мл) и их смесью (соотношение 1:1) на модели дексаметазон-индуцированного сахарного диабета второго типа у лабораторных животных. Определение концентрации глюкозы в крови проводили при помощи портативного глюкометра «AccuChek Active» (Roche Diabetes Care, Germany). Наличие глюкозурии и кетонурии устанавливали с помощью тест-полосок «Кетоглюк-1» (Биосенсор АН, Россия). Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Microsoft Excel по ОФС.1.1.0013.15.

Результаты и обсуждение. Результаты содержания глюкозы и кетонов в моче показали, что в процессе моделирования сахарного диабета для всех групп животных характерна глюкозурия и кетонурия, что подтверждало формирование патологического процесса у крыс. Меньшее содержание глюкозы и кетонов в моче обнаружилось у группы животных, которые получали комплекс рутина с цинком (концентрация глюкозы – менее 2,3 ммоль/л, концентрация кетонов – менее 0,2 ммоль/л). Измерение концентрации глюкозы в крови показало, что комплекс рутина с цинком обладает наиболее выраженным гипогликемическим эффектом, в то время как водное извлечение из побегов черники и водный раствор цинка хлорида оказывают минимальное противодиабетическое действие (содержание глюкозы в крови – 6,9 ммоль/л против 8,1 ммоль/л и 7,9 ммоль/л соответственно).

Заключение. Изучение влияния элементов в составе фенольных комплексов на течение сахарного диабета показало, что введение минералов положительно сказывается на степени выраженности фармакологического эффекта, что может служить подтверждением гипотезы о потенцировании противодиабетического действия фенольных соединений при их существовании в виде минеральных комплексов. Так, комплекс рутина с цинком проявлял максимальную активность в сравнении с раствором цинка хлорида, извлечения из побегов черники и их смеси, что позволяет утверждать, что форма существования природных фенольных соединений в составе минеральных комплексов является оптимальной как с точки зрения накопления, так и со стороны проявления фармакологического ответа. Результаты исследования создают предпосылки для дальнейшего изучения влияния различных элементов в комбинации с маркерными фенольными компонентами противодиабетических растительных препаратов на течение сахарного диабета, а также дают возможность сделать вывод о том, что природные минеральные комплексы обладают профилактическим действием в отношении данной патологии.

Ключевые слова: черника обыкновенная, минеральные комплексы, цинк, рутин, сахарный диабет

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

Вклад авторов. И. И. Тернинко, Д. Ю. Ивкин, В. И. Топоркова и Е. В. Вишняков придумали эксперимент и разработали методику его проведения. В. И. Топоркова и Е. В. Вишняков провели исследовательскую работу и статистическую обработку результатов. И. И. Тернинко, Д. Ю. Ивкин, В. И. Топоркова, Е. В. Вишняков и К. О. Сидоров участвовали в обсуждении результатов эксперимента и подготовке текста статьи.

Финансиование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП "Аналитический центр" ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Топоркова В. И., Вишняков Е. В., Сидоров К. О., Тернинко И. И., Ивкин Д. Ю. Оценка влияния минерального комплекса рутина на степень выраженности противодиабетической активности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):197-205. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-197-205](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-197-205)

Assessment of the Influence of the Mineral Complex of Rutin on the Degree of Expression of Anti-diabetic Activity

Valeriya I. Toporkova*, Evgeniy V. Vishnyakov, Kirill O. Sidorov, Inna I. Terninko, Dmitriy Yu. Ivkin

*Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Valeriya I. Toporkova. E-mail: toporkova.valeriya@pharminnotech.com

ORCID: Valeriya I. Toporkova – <https://orcid.org/0000-0002-5985-5156>; Evgeniy V. Vishnyakov – 0000-0002-4716-7866; Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; Dmitriy Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Received: 20.10.2021 Revised: 16.12.2021 Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Type 2 diabetes mellitus is currently considered one of the most common non-communicable diseases. For the prevention and concomitant treatment of this pathology, various herbal remedies are successfully used, such as, for example, blueberry shoots. The plant contains phenolic compounds (anthocyanins, flavonoids, phenolcarboxylic and organic acids), which have antioxidant and hypoglycemic effects, and also accumulates macro- and microelements (Ca, Mg, Zn, Mn), which in turn can affect the course of diabetes mellitus. Complexes of elements with phenolic biological active substances (BAS) can affect the formation of a pharmacological response or change its severity. Therefore, it is possible to put forward a hypothesis about the potentiation of the antidiabetic action of phenolic compounds when they exist in the form of mineral complexes.

Aim. To carry out a comparative assessment of the antidiabetic activity of the mineral complex rutin with zinc in comparison with precursor substances and extraction from blueberry shoots to predict the effect of elements on the course of this pathology.

Materials and methods. The objects of the study were an aqueous solution ($C = 0.18 \text{ mg/ml}$) of a model complex of rutin with zinc with a molar ratio of components of 1:1 and blueberry shoots purchased from a pharmacy in St. Petersburg. According to the information on the packaging, the region of raw material procurement is Altai Territory, Barnaul, the period for harvesting blueberries is July 2020. The complex of rutin with zinc was obtained according to the method described in the literature from the pharmaceutical substance rutin (Rutin, batch 332, valid until 26.03.2023, Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., China, FS 000569-060514) and an aqueous solution ($C = 0.13 \text{ mg/ml}$) zinc chloride (Zinc chloride, batch 39/G 4, valid until 09.10.2021, Neva Reaktiv, Russia, STP TU COMP 1-533-2012). The optimal ratio of components 1:1 for the formation of a mineral complex was established by us earlier experimentally using the Job's method. The mass of zinc chloride, which must be added to the extraction, and the mass of the complex for the preparation of its aqueous solution were calculated on the basis of the quantitative content of biologically active substances in blueberry shoots and the molar ratio of the components involved in the formation of the complex compound determined by the spectral method. The quantitative content of the main groups of biologically active substances (flavonoids, hydroxycinnamic acids, organic acids) was determined spectrophotometrically on SF-2000 instrument (Russia) and titrimetrically using the methods presented in Russian Pharmacopoeia XIV FS.2.5.0093.18 and FS.2.5.0012.15. The antidiabetic effect of the complex of rutin with zinc was evaluated in comparison with an aqueous extract from the shoots of common blueberries (the ratio of raw materials: extractant – 1:80), an aqueous solution of zinc chloride (concentration – 0.36 mg/ml) and their mixture (ratio 1:1) on a model of dexamethasone-induced type 2 diabetes mellitus in laboratory animals. Determination of blood glucose concentration was carried out using a portable glucometer "AccuChek Active" (Roche Diabetes Care, Germany). The presence of glucosuria and ketonuria was established using Ketoglyuk-1 test strips (Biosensor AN, Russia). Statistical processing of the results was carried out using the Microsoft Excel program according to OFS.1.1.0013.15.

Results and discussion. The results of the content of glucose and ketones in urine showed that in the process of modeling diabetes mellitus, glucosuria and ketonuria are characteristic for all groups of animals, which confirmed the formation of a pathological process in rats. A lower content of glucose and ketones in urine was found in a group of animals that received a complex of rutin with zinc (glucose concentration – less than 2.3 mmol/l, ketone concentration – less than 0.2 mmol/l). Measurement of the concentration of glucose in the blood showed that the complex of rutin with zinc has the most pronounced hypoglycemic effect, while the water extract from blueberry shoots and an aqueous solution of zinc chloride have a minimal antidiabetic effect (blood glucose is 6.9 mmol/l versus 8.1 mmol/l and 7.9 mmol/l, respectively).

Conclusion. The study of the influence of elements in the composition of phenolic complexes on the course of diabetes mellitus showed that the introduction of minerals has a positive effect on the severity of the pharmacological effect, which can serve as confirmation of the hypothesis about the potentiation of the antidiabetic effect of phenolic compounds when they exist in the form of mineral complexes. Thus, the complex of rutin with zinc showed the maximum activity in comparison with the solution of zinc chloride, extraction from blueberry shoots and their mixture, which suggests that the form of existence of natural phenolic compounds in the composition of mineral complexes is optimal both from the point of view of accumulation and from the side manifestations of a pharmacological response. The results of the study create the preconditions for further study of the effect of various elements in combination with marker phenolic components of antidiabetic herbal preparations on the course of diabetes mellitus, and also make it possible to conclude that natural mineral complexes have a prophylactic effect against this pathology.

Keywords: common blueberry, mineral complexes, zinc, rutin, diabetes mellitus

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. Inna I. Terninko, Dmitriy Yu. Ivkin, Valeriya I. Toporkova, Evgeniy V. Vishnyakov – methodology, conceptualization. Valeriya I. Toporkova, Evgeniy V. Vishnyakov – research and statistical processing of the results. Inna I. Terninko, Dmitriy Yu. Ivkin, Valeriya I. Toporkova, Evgeniy V. Vishnyakov, Kirill O. Sidorov – discussion of results of the experiment, preparation of the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center" of the Federal State Budgetary Educational University of Higher Education SPCPU of the Ministry of Health of Russia in the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Toporkova V. I., Vishnyakov E. V., Sidorov K. O., Terninko I. I., Ivkin D. Yu. Assessment of the influence of the mineral complex of rutin on the degree of expression of anti-diabetic activity. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):197-205. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-197-205](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-197-205)

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 2 типа является одним из самых часто встречающихся неинфекционных заболеваний в мире наряду с онкологией и патологиями сердечно-сосудистой системы [1]. По данным международной федерации диабета на 2019 год число людей в возрасте от 20 до 79 лет с сахарным диабетом составляло 463 миллиона, по прогнозам их количество к 2045 году возрастет до 700 миллионов. 374 миллиона человек имеют повышенный риск развития сахарного диабета 2 типа в связи с большим количеством предрасполагающих к нему факторов. При этом 54 % случаев заболевания сахарным диабетом диагностируется по обращаемости в рутинной клинической практике и 46 % случаев выявляется путем активного скрининга [2–4].

Фитотерапия на сегодняшний день используется в сопутствующем лечении и профилактике сахарного диабета 2 типа. В частности, побеги черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus L.*) содержат в своем составе фенольные соединения (флавоноиды (в т. ч. антоцианы), фенолкарбоновые кислоты, органические кислоты), которые проявляют доказанную противодиабетическую активность [5–7]. В основе механизма данного эффекта лежит антиоксидантная активность фенольных соединений. Кроме того, известно [8], что сочетание различных фенольных соединений (рутин, гиперозид, хлорогеновая кислота и др.), которые входят в состав черники, аддитивно воздействует на а-глюзидазу [9] – фермент, катализирующий расщепление сложных углеводов до глюкозы. Также в побегах черники в больших количествах содержатся дельфинидин и его гликозид (миртиллин) – фенольные соединения, относящиеся к группе антоцианов [10]. Помимо антиоксидантного действия они способны изменять экспрессию генов адипоцитов, которые косвенно участвуют в развитии сахарного диабета, увеличивать секрецию инсулина и повышать чувствительность тканей к нему [11]. Также согласно литературным данным [12, 13] побеги черники обыкновенной имеют разнообразный элементный состав (хром, кальций, магний, цинк, марганец, медь, селен и др.), что позитивно сказывается на проявлении противодиабетического действия [14–17] комплексных растительных препаратов на основе данного ЛРС.

Растительные фенольные соединения (лиганды) и микро-, макроэлементы (комплексообразователи) являются структурными компонентами минеральных комплексов, представляющих особый интерес с точки зрения биологической активности относительно ряда заболеваний, в том числе и сахарного диабета [18, 19].

Поэтому **целью исследования** было провести сравнительную оценку противодиабетической активности модельного минерального комплекса рутин с цинком в сравнении с веществами предшественниками, которые накапливают побеги черники, и извлечением из побегов черники для прогнозирования влияния элементов на течение данной патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были водный раствор ($C=0,18$ мг/мл) модельного комплекса рутина с цинком с соотношением числа моль компонентов 1:1 и побеги черники обыкновенной, приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга. По информации на упаковке регион заготовки сырья – Алтайский край, г. Барнаул, период заготовки черники – июль 2020 года. Комплекс рутина с цинком получали по методике, приведенной в литературе [20] из фармацевтической субстанции рутина (*Rutin, партия 332, годен до 26.03.2023, Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., Китай, ФС 000569-060514*) и водного раствора ($C=0,13$ мг/мл) цинка хлорида (Цинк хлористый 6/в, партия 39/G 4, годен до 09.10.2021, Нева Реактив, Россия, СТП ТУ КОМП 1-533-2012). Оптимальное соотношение компонентов 1:1 для формирования минерального комплекса, установлено нами ранее экспериментально с применением метода Джоба [21].

Массу цинка хлорида, которую необходимо добавить к извлечению, и массу комплекса для приготовления его водного раствора рассчитывали на основании количественного содержания отдельных классов фенольных соединений в побегах черники и определенного спектральным методом мольного соотношения компонентов, участвующих в образовании комплексного соединения. Количества сырья и субстанций, используемых для приготовления извлечений и водных растворов веществ-предшественников, были рассчитаны на основании данных количественного определения групп БАВ (флавоноидов в пересчете на рутин, гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, органических кислот в пересчете на яблочную кислоту) в сырье черники обыкновенной. Количественное содержание основных групп БАВ определяли спектрофотометрически (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты) на приборе СФ-2000 (Россия) и титриметрически (органические кислоты) с использованием методик, представленных в ГФ XIV ФС.2.5.0093.18 и ФС.2.5.0012.15 [22].

Противодиабетическое действие комплекса рутина с цинком оценивали в сравнении с водным извлечением из побегов черники обыкновенной (соотношение сырье:экстрагент – 1:80), водным раствором цинка хлорида (концентрация – 0,36 мг/мл) и их смесью (соотношение 1:1) на модели дексаметазон-индуцированного сахарного диабета второго типа у лабораторных животных. Определение концентрации глюкозы в крови проводили при помощи портативного глюкометра «AccuChek Active» (Roche Diabetes Care, Germany). Наличие глюкозурии и кетонурии устанавливали с помощью тест-полосок «Кетоглюк-1» (Биосенсор АН, Россия).

Исследование проводилось на крысах-самцах массой от 270 до 290 г. Было сформировано 5 групп по 6 животных (в т. ч. 1 контрольная). В течение 8 недель животные находились на высокожировой диете (21 % жира, 41 % фруктозы, 1,25 % холестерина,

36,75 % стандартного корма для лабораторных крыс). На 7 и 8 неделе крысам ежедневно подкожно вводили дексаметазон в дозе 0,4 мг/кг массы тела животного [23]. На протяжении всего исследования крысы внутрижелудочно получали исследуемые растворы в объеме 1,7 мл.

Расчет ориентировочных дозировок объектов исследования для изучения противодиабетической активности проводился следующим образом:

- Согласно информации на упаковке для приготовления настоя из побегов черники обыкновенной необходимо 1,25 г лекарственного растительного сырья (ЛРС) и 100 мл экстрагента (свежекипяченая вода).
- Расчет объема препарата для внутрижелудочного введения на 1 крысу:

$$\text{Доза} = \frac{\text{ТД} \cdot \text{КП} \cdot m}{70},$$

где ТД – терапевтическая доза для человека средней массой тела 70 кг; КП – коэффициент пересчета доз для лабораторных животных (для крыс КП = 6,2); m – масса тела лабораторного животного, кг.

$$\text{Доза} = \frac{100 \cdot 62 \cdot 0,28}{70} = 25 \text{ мл.}$$

- Исходя из данных таблицы 1 производили расчет массы (1) и количества вещества (2) конкретной группы БАВ в 1,25 г ЛРС с помощью формул:

$$m_{\text{БАВ}} = \frac{C_{\text{БАВ}} \cdot 1,25}{100}, \quad (1)$$

$$n_{\text{БАВ}} = \frac{m_{\text{БАВ}}}{M}, \quad (2)$$

где $C_{\text{БАВ}}$ – содержание БАВ в 100 г ЛРС, % (таблица 1); M – молярная масса БАВ

- Учитывая, что оптимальное соотношение компонентов для проведения процесса комплексообразования – 1:1, количество вещества цинка хлори-

да, необходимое для получения комплекса составляет $n_{\text{ZnCl}_2} = n_{\text{БАВ}}$.

Результаты опорных значений (по п. 3 и 4) для расчетов дозировок представлены в таблице 1:

- Массу цинка хлорида (ZnCl_2) в граммах, необходимую для добавления к извлечению из побегов черники и для приготовления водного раствора, находили по формуле:

$$m_{\text{ZnCl}_2} (n_{1(\text{ZnCl}_2)} + n_{2(\text{ZnCl}_2)} + n_{3(\text{ZnCl}_2)}) \cdot M_{(\text{ZnCl}_2)} = \\ = (2,6 \cdot 10^{-5} + 4,8 \cdot 10^{-5} + 19 \cdot 10^{-5}) \cdot 136,3 = 0,036 \text{ г.}$$

- Массу комплекса рутина с цинком в граммах для приготовления водного раствора рассчитывали по формуле:

$$m_{\text{комплекса}} = (M_{\text{рутина безв.}} + M_{\text{Zn}}) \cdot n_{\text{флав}} = (608,5 + 65,4) \cdot 2,6 \cdot 10^{-5} = 0,018.$$

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Microsoft Excel в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Динамику развития нарушения гликемии контролировали по показателям: масса тела, содержание глюкозы в крови, уровень глюкозы и кетонов в моче. В процессе моделирования сахарного диабета 2 типа у всех групп лабораторных животных наблюдалось первоначальное увеличение веса в 1,2 раза, связанное с потреблением большого количества жиров, так как животные содержались на высокожировой диете. После начала ежедневного введения дексаметазона и по окончании эксперимента наблюдалось снижение веса крыс. Это дает возможность предположить о протекании патологических изменений поджелудочной железы, в связи с которыми уменьшилось

Таблица 1. Опорные значения для расчетов дозировок объектов исследования

Table 1. Reference values for calculating dosages of research objects

№	Группа БАВ в пересчете на конкретное соединение Group of biologically active substances (BAS) in terms of a specific compound	$C_{\text{БАВ}}, \%$ $C_{\text{BAS}}, \%$	$m_{\text{БАВ}}, \text{г}$ m_{BAS}, g	$M_{\text{БАВ}}, \text{г/моль}$ $M_{\text{BAS}}, \text{g/mol}$	$n_{\text{БАВ}}, \text{моль}$ $n_{\text{BAS}}, \text{mol}$	$n(\text{ZnCl}_2), \text{моль}$ $n(\text{ZnCl}_2), \text{mol}$
1	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин The sum of flavonoids in terms of rutin	1,35	0,017	664,6	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$
2	Сумма фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту The sum of phenol carboxylic acids in terms of chlorogenic acid	1,39	0,017	354,3	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$
3	Сумма органических кислот в пересчете на яблочную кислоту The sum of organic acids in terms of malic acid	2,11	0,026	134,1	$19 \cdot 10^{-5}$	$19 \cdot 10^{-5}$

поступление глюкозы в ткани организма и началась мобилизация запасов жиров для синтеза АТФ, а также глюкозурия и кетонурия, что подтверждало формирование патологического процесса (таблица 2).

Таблица 2. Результаты динамики массы тела лабораторных животных

Table 2. The results of the dynamics of the body weight of laboratory animals

Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{cp} \pm \Delta x, g$	$\epsilon, \%$
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i> <i>Water extraction from common blueberry shoots</i>		
Начало эксперимента Start experiment	278 ± 30	10,8
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	346 ± 31	9,0
Окончание эксперимента End of experiment	298 ± 26	8,7
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i> <i>Water extract from blueberry shoots with zinc</i>		
Начало эксперимента Start experiment	283 ± 13	4,5
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	325 ± 28	8,7
Окончание эксперимента End of experiment	278 ± 32	11,5
<i>Водный раствор цинка хлорида</i> <i>Zinc chloride aqueous solution</i>		
Начало эксперимента Start experiment	289 ± 7	2,5
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	339 ± 54	15,9
Окончание эксперимента End of experiment	284 ± 53	18,6
<i>Водный раствор комплекса рутина с цинком</i> <i>Aqueous solution of Zn-rutin complex</i>		
Начало эксперимента Start experiment	281 ± 10	3,6
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	334 ± 14	4,2
Окончание эксперимента End of experiment	286 ± 32	11,2
<i>Контрольная группа</i> <i>Control group</i>		
Начало эксперимента Start experiment	279 ± 15	5,4
6 неделя 6 week	329 ± 22	6,7
Окончание эксперимента End of experiment	280 ± 17	6,1

Динамика массы тела лабораторных животных на разных этапах исследования представлена в виде диаграммы на рисунке 1.

Анализ содержания глюкозы и кетонов в моче (таблица 3) показал, что в процессе моделирования сахарного диабета для всех групп животных характерна глюкозурия и кетонурия, что подтверждало форми-

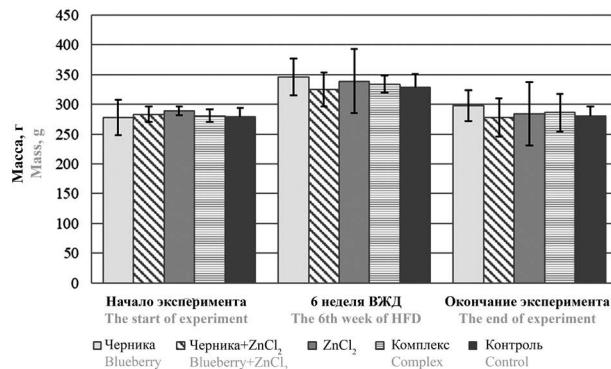


Рисунок 1. Динамика массы тела лабораторных животных на разных этапах исследования

Figure 1. Dynamics of the body weight of laboratory animals at different stages of the study

рование патологического процесса у крыс. Меньшее содержание глюкозы и кетонов в моче обнаружилось у группы животных, которые получали комплекс рутина с цинком (концентрация глюкозы – менее 2,3 ммоль/л, концентрация кетонов – менее 0,2 ммоль/л).

Таблица 3. Результаты измерения концентрации глюкозы и кетонов в моче

Table 3. The results of measuring the concentration of glucose and ketones in urine

Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{cp} \pm \Delta x, \text{ммоль/л}$ $\bar{x}_{av} \pm \Delta x, \text{mmol/l}$	$\epsilon, \%$
<i>Результаты измерения концентрации глюкозы в моче</i> <i>The results of measuring the concentration of glucose in urine</i>		
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i> <i>Water extract from common blueberry shoots</i>		
Начало эксперимента Start experiment	2,3 ± 0,3	13,1
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	4,7 ± 0,7	14,9
Окончание эксперимента End of experiment	2,8 ± 0,4	14,3
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i> <i>Water extract from blueberry shoots with zinc</i>		
Начало эксперимента Start experiment	2,3 ± 0,3	13,1
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	2,8 ± 0,4	14,3
Окончание эксперимента End of experiment	2,8 ± 0,4	14,3
<i>Водный раствор цинка хлорида</i> <i>Zinc chloride aqueous solution</i>		
Начало эксперимента Start experiment	2,3 ± 0,3	13,1
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	2,8 ± 0,4	14,3
Окончание эксперимента End of experiment	2,8 ± 0,4	14,3

Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{\text{ср.}} \pm \Delta x$, ммоль/л $\bar{x}_{\text{ав.}} \pm \Delta x$, mmol/l	ϵ , %
Водный раствор комплекса рутина с цинком <i>Aqueous solution of Zn-rutin complex</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	$1,8 \pm 0,4$	22,3
Окончание эксперимента End of experiment	$2,3 \pm 0,3$	13,1
Контрольная группа <i>Control group</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	
6 неделя 6 week	$2,3 \pm 0,4$	17,4
Окончание эксперимента End of experiment	$5,6 \pm 0,5$	9,0
Результаты измерения концентрации кетонов в моче <i>The results of measuring the concentration of ketones in urine</i>		
Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{\text{ср.}} \pm \Delta x$, ммоль/л $\bar{x}_{\text{ав.}} \pm \Delta x$, mmol/l	ϵ , %
Водное извлечение из побегов черники обыкновенной <i>Water extraction from common blueberry shoots</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	$0,2 \pm 0,03$	15,0
Окончание эксперимента End of experiment	$0,4 \pm 0,10$	25,0
Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком <i>Water extract from blueberry shoots with zinc</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	

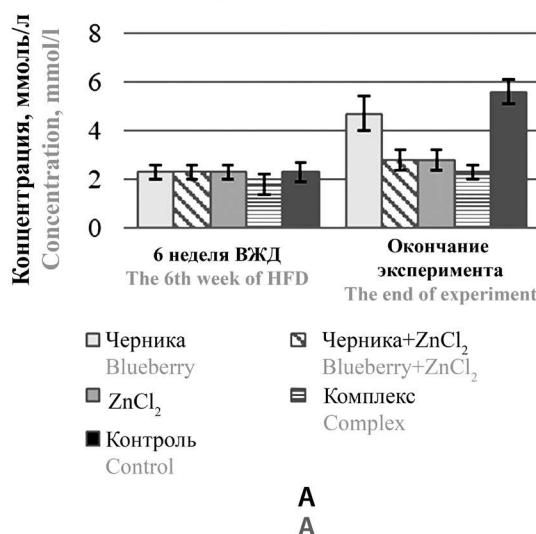


Рисунок 2. Динамика содержания в моче:

А – глюкозы, Б – кетонов

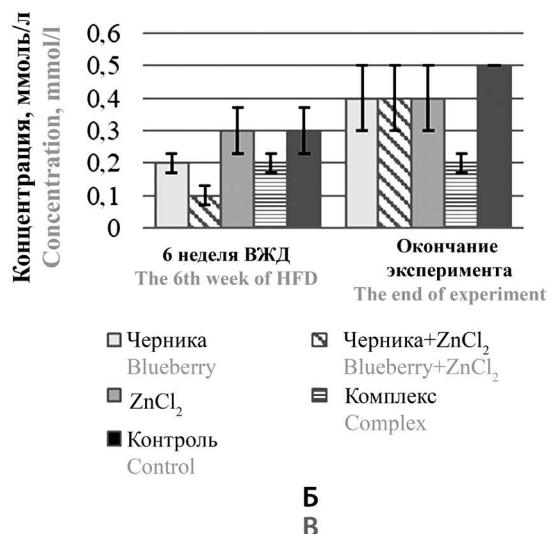
Figure 2. Dynamics of content in urine:

А – glucose, Б – ketones

Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{\text{ср.}} \pm \Delta x$, ммоль/л $\bar{x}_{\text{ав.}} \pm \Delta x$, mmol/l	ϵ , %
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	$0,1 \pm 0,03$	30,0
Окончание эксперимента End of experiment	$0,4 \pm 0,10$	25,0
Водный раствор цинка хлорида <i>Zinc chloride aqueous solution</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	$0,3 \pm 0,07$	23,4
Окончание эксперимента End of experiment	$0,4 \pm 0,10$	25,0
Водный раствор комплекса рутина с цинком <i>Aqueous solution of Zn-rutin complex</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	$0,2 \pm 0,03$	15,0
Окончание эксперимента End of experiment	$0,2 \pm 0,03$	15,0
Контрольная группа <i>Control group</i>		
Начало эксперимента Start experiment	Вариант нормы Variant of the norm	
6 неделя 6 week	$0,3 \pm 0,07$	23,4
Окончание эксперимента End of experiment	$0,5 \pm 0,01$	2,0

Динамика содержания в моче глюкозы и кетонов представлена в виде диаграммы на рисунке 2.

Измерение концентрации глюкозы в крови показало, что комплекс рутина с цинком обладает наиболее выраженным гипогликемическим эффектом (таб-



Б

лица 4), в то время как водное извлечение из побегов черники и водный раствор цинка хлорида оказывают минимальное противодиабетическое действие в ряду изучаемых объектов (содержание глюкозы в крови – 6,9 ммоль/л против 8,1 ммоль/л и 7,9 ммоль/л соответственно). При этом стоит отметить, что смесь извлечения из побегов черники и водного раствора цинка хлорида (в соотношении 1:1) вызывает меньшее нарушение гликемии (7,5 ммоль/л), чем данные растворы при индивидуальном применении.

Таблица 4. Результаты измерения концентрации глюкозы в крови

Table 4. The results of measuring the concentration of glucose in the blood

Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{cp.} \pm \Delta x$, ммоль/л $\bar{x}_{av} \pm \Delta x$, mmol/l	ϵ , %
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной</i> <i>Water extraction from common blueberry shoots</i>		
Начало эксперимента Start experiment	6,6 ± 0,6	9,0
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	4,9 ± 0,5	10,2
1 неделя введения дексаметазона 1-week of dexamethasone injections	5,5 ± 0,8	14,6
2 неделя введения дексаметазона 2-week of dexamethasone injections	6,1 ± 0,6	9,9
Окончание эксперимента End of experiment	8,1 ± 0,9	11,2
<i>Водное извлечение из побегов черники обыкновенной с цинком</i> <i>Water extract from blueberry shoots with zinc</i>		
Начало эксперимента Start experiment	6,7 ± 0,4	6,0
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	4,3 ± 0,6	14,0
1 неделя введения дексаметазона 1-week of dexamethasone injections	6,0 ± 0,3	5,0
2 неделя введения дексаметазона 2-week of dexamethasone injections	6,1 ± 0,5	8,4
Окончание эксперимента End of experiment	7,5 ± 1,3	17,4
<i>Водный раствор цинка хлорида</i> <i>Zinc chloride aqueous solution</i>		
Начало эксперимента Start experiment	6,8 ± 0,7	10,3
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	4,3 ± 0,5	11,7
1 неделя введения дексаметазона 1-week of dexamethasone injections	5,4 ± 0,9	16,7
2 неделя введения дексаметазона 2-week of dexamethasone injections	6,3 ± 0,2	3,2

Этапы проведения эксперимента Experiment steps	Результаты (n = 6) Results (n = 6)	
	$\bar{x}_{cp.} \pm \Delta x$, ммоль/л $\bar{x}_{av} \pm \Delta x$, mmol/l	ϵ , %
Окончание эксперимента End of experiment	7,9 ± 1,1	14,0
<i>Водный раствор комплекса рутина с цинком</i> <i>Aqueous solution of Zn-rutin complex</i>		
Начало эксперимента Start experiment	7,1 ± 0,8	11,3
6 неделя ВЖД 6-week high fat diet	5,1 ± 0,7	13,8
1 неделя введения дексаметазона 1-week of dexamethasone injections	5,7 ± 0,5	8,8
2 неделя введения дексаметазона 2-week of dexamethasone injections	6,0 ± 0,6	10,0
Окончание эксперимента End of experiment	6,9 ± 1,2	17,4
<i>Контрольная группа</i> <i>Control group</i>		
Начало эксперимента Start experiment	6,8 ± 0,8	11,8
6 неделя 6 week	5,2 ± 0,9	17,3
1 неделя введения дексаметазона 1-week of dexamethasone injections	5,4 ± 0,9	16,7
2 неделя введения дексаметазона 2-week of dexamethasone injections	6,6 ± 0,4	6,1
Окончание эксперимента End of experiment	10,8 ± 1,8	16,7

Динамика содержания глюкозы в крови у лабораторных животных также представлена в виде диаграммы на рисунке 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение влияния элементов в составе фенольных минеральных комплексов на течение сахарного диабета показало, что введение минералов положительно сказывается на степени выраженности фармакологического эффекта и может служить подтверждением гипотезы о потенцировании противодиабетического действия фенольных соединений при их существовании в виде комплексных соединений с металлами. Так, комплекс рутина с цинком проявлял максимальную активность в сравнении с раствором цинка хлорида, извлечения из побегов черники и их смеси, что позволяет утверждать, что форма существования природных фенольных соединений в составе минеральных комплексов является оптимальной как с точки зрения накопления, так и со стороны проявления фармакологического ответа. Результаты исследования создают предпосылки для дальнейшего изучения влияния различных элементов в ком-

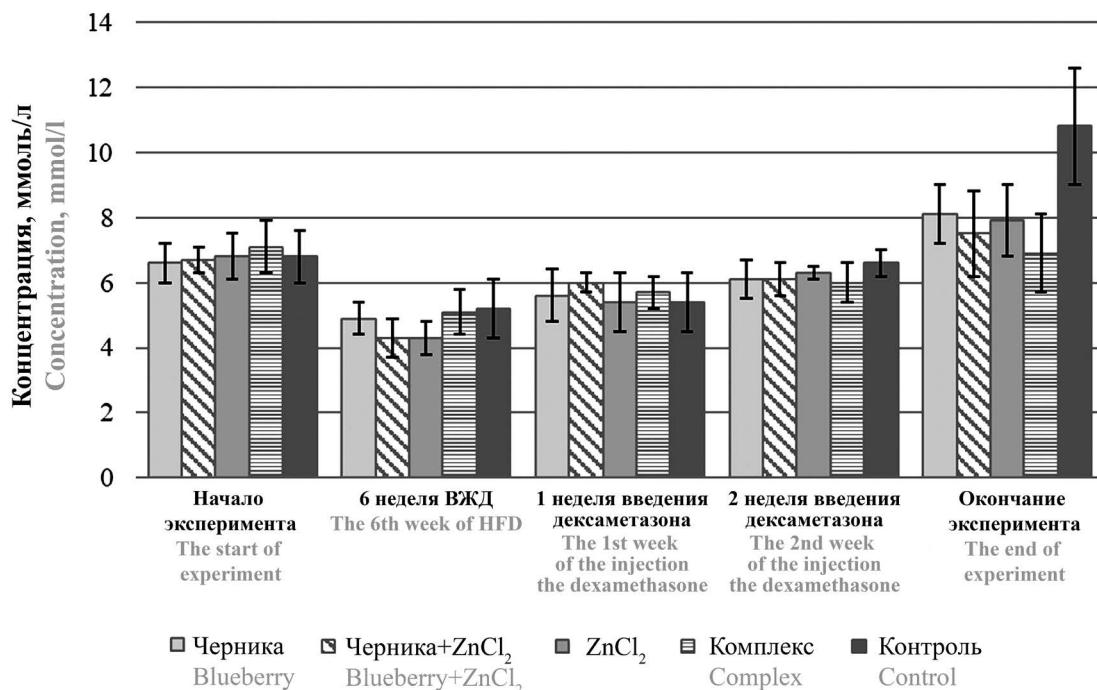


Рисунок 3. Динамика содержания глюкозы в крови у лабораторных животных

Figure 3. Dynamics of blood glucose in laboratory animals

бинации с маркерными фенольными компонентами противодиабетических растительных препаратов на течение сахарного диабета, а также дают возможность сделать вывод о том, что природные минеральные комплексы обладают профилактическим действием в отношении данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Diabetes facts & Figures. Available at: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>. Accessed: 07.06.2021.
2. Дедов И. И. Сахарный диабет – опаснейший вызов мировому сообществу. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;22;67(1):7–13. DOI: 10.15690/vramn.v67i1.103.
3. Левит Ш., Филиппов Ю. И., Горелышев А. С. Сахарный диабет 2 типа: время изменить концепцию. *Сахарный диабет*. 2013;16(1):91–102. DOI: 10.14341/2072-0351-3603.
4. Шарофова М. У. Сагдиева С. С., Юсуфи С. Д. Сахарный диабет: современное состояние вопроса (часть 1). *Вестник Авиценны*. 2019;21(3):502–512. DOI: 10.25005/2074-0581-2019-21-3-502-512.
5. Dinda B., Dinda M., Roy A., Dinda S. Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2020;120:159–235. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2019.08.006.
6. Повыдыш М. Н., Лужанин В. Г., Ивкин Д. Ю., Белоусов М. В., Яковлев Г. П. Перспективы использования фитотерапевтических средств при нарушениях жирового и углеводного обменов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(3):130–135.
7. Ștefanescu Braic R., Vari C., Imre S., Huțanu A., Fogarasi E., Todea T., Groșan A., Eșanu S., Laczkó-Zöld E., Dogaru M. Vaccinium extracts as modulators in experimental type 1 diabetes. *Journal of Medicinal Food*. 2018;21(11):1106–1112. DOI: 10.1089/jmf.2017.0141.
8. Bljajić K., Petlevski R., Vujić L., Čačić A., Šoštaric N., Jablan J., de Carvalho I. S., Koncic M. Z. Chemical composition, antioxidant and α -glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of *Vaccinium myrtillus* leaves. *Molecules*. 2017;28;22(5):703. DOI: 10.3390/molecules22050703.
9. Pires T. C. S. P., Caleja C., Santos-Buelga C., Barros L., Ferreira I. C. F. R. *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a novel source of phenolic compounds with health benefits and industrial applications: A Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(16):1917–1928. DOI: 10.2174/1381612826666200317132507.
10. Karcheva-Bahchevanska D. P., Lukova P. K., Nikolova M. M., Mladenov R. D., Iliev I. N. Effect of extracts of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) on amyloglucosidase and α -glucosidase activity. *Folia Medica*. 2017;1;59(2):197–202. DOI: 10.1515/folmed-2017-0028.
11. Georgieva M. Antioxidant capacity and anthocyanin composition of Bulgarian bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *MOJ Food Processing & Technology*. 2018;16;6(2). DOI: 10.15406/mojfpt.2018.06.00162.
12. Макарова М. П., Сыроежкин А. В., Максимова Т. В., Матвеева И. С., Плетенёва Т. В. Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофициальных растениях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):93–97. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-93-97.
13. Andresen E., Peiter E., Küpper H. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2018;13;69(5):909–954. DOI: 10.1093/jxb/erx465.
14. Cefalu W., Stephens J., Ribnicky D. Diabetes and Herbal (Botanical) Medicine. *Herbal Medicine*. CRC Press. 2011;28:405–418. DOI: 10.1201/b10787-20.
15. Murray M. T. *Vaccinium myrtillus* (Bilberry). *Textbook of Natural Medicine*. 2013;1080–1085. DOI: 10.1016/b978-1-4377-2333-5.00132-2.
16. Jayawardena R., Ranasinghe P., Galappathy P., Malkanthi R., Constantine G., Katulanda P. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. Springer Science and Business Media LLC. 2012;19:4–13. DOI: 10.1186/1758-5996-4-13.
17. Bjorklund G., Dadar M., Pivina L., Doşa M. D., Semenova Y., Aaseth J. The role of Zinc and Copper in insulin resistance and diabetes mellitus. *Current Medicinal Chemistry*. 2020;27(39):6643–6657. DOI: 10.2174/092986732666190902122155.

18. Selvaraj S., Krishnaswamy S., Devashya V., Sethuraman S., Krishnan U. M. Flavonoid-metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews*. 2013;29(4):677–702. DOI: 10.1002/med.21301.
19. Kasprzak M. M., Erxleben A., Ochocki J. ChemInform abstract: properties and applications of flavonoid metal complexes. *Chem-Inform*. 2015;46(29):45853–45877. DOI: 10.1002/chin.201529267.
20. Da Silva H. C., De Souza L. A., Dos Santos H. F., De Almeida W. B. Determination of anticancer Zn(II)–Rutin complex structures in solution through density functional theory calculations of 1H NMR and UV–VIS spectra. *ACS Omega*. 2020;6;5(6):3030–3042. DOI: 10.1021/acsomega.9b04174.
21. Renny J. S., Tomasevich L. L., Tallmadge E. H., Collum D. B. Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;24;52(46):11998–12013. DOI: 10.1002/anie.201304157.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 30.03.2021.
23. Чуканова Г. Н. Моделирование сахарного диабета 2 типа для изучения лекарственных средств с антидиабетической активностью. *Наука и здравоохранение*. 2014;4:12–18.

REFERENCES

1. Diabetes facts & Figures. Available at: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>. Accessed: 07.06.2021.
2. Dedov I. I. Diabetes mellitus – a dangerous treat to the mankind. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskikh nauk = Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012;22;67(1):7–13. (In Russ.) DOI: 10.15690/vramn.v67i1.103.
3. Levit S., Filippov Yu. I., Gorelyshev A. S. Type 2 diabetes mellitus: time to change the concept. *Sakharney diabet = Diabetes mellitus*. 2013;16(1):91–102. (In Russ.) DOI: 10.14341/2072-0351-3603.
4. Sharofova M. U., Sagdieva S. S., Yusufi S. D. Diabetes mellitus: the modern state of the issue (part 1). *Vestnik avitsen-ny = Avicenna Bulletin*. 2019;21(3):502–512. (In Russ.) DOI: 10.25005/2074-0581-2019-21-3-502-512.
5. Dinda B., Dinda M., Roy A., Dinda S. Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2020;120:159–235. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2019.08.006.
6. Povydhysh M. N., Luzhanin V. G., Ivkin D. Yu., Belousov M. V., Yakovlev G. P. Prospects of using phytotherapy at disorders of fat and carbohydrate metabolism. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(3):130–135. (In Russ.)
7. Ștefănescu Braic R., Vari C., Imre S., Huțanu A., Fogarasi E., Todea T., Groșan A., Eșanu S., Laczkó-Zöld E., Dogaru M. *Vaccinium* extracts as modulators in experimental type 1 diabetes. *Journal of Medicinal Food*. 2018;21(11):1106–1112. DOI: 10.1089/jmf.2017.0141.
8. Bljajić K., Petlevski R., Vujić L., Čačić A., Šoštarić N., Jablan J., de Carvalho I. S., Koncic M. Z. Chemical composition, antioxidant and α -glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of *Vaccinium myrtillus* leaves. *Molecules*. 2017;28;22(5):703. DOI: 10.3390/molecules22050703.
9. Pires T. C. S. P., Caleja C., Santos-Buelga C., Barros L., Ferreira I. C. F. R. *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a novel source of phenolic compounds with health benefits and industrial applications: A Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(16):1917–1928. DOI: 10.2174/138161286666200317132507.
10. Karcheva-Bahchevanska D. P., Lukova P. K., Nikolova M. M., Mladenov R. D., Iliev I. N. Effect of extracts of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) on amyloglucosidase and α -glucosidase activity. *Folia Medica*. 2017;1;59(2):197–202. DOI: 10.1515/folmed-2017-0028.
11. Georgieva M. Antioxidant capacity and anthocyanin composition of Bulgarian bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *MOJ Food Processing & Technology*. 2018;16;6(2). DOI: 10.15406/mojfpt.2018.06.00162.
12. Makarova M. P., Syroeshkin A. V., Maksimova T. V., Matveeva I. S., Pleteneva T. V. Features of microelements express-determination in medicinal and nonofficinal plants by X-ray-fluorescence analysis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):93–97. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-93-97.
13. Andresen E., Peiter E., Küpper H. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2018;13;69(5):909–954. DOI: 10.1093/jxb/erx465.
14. Cefalu W., Stephens J., Ribnicky D. Diabetes and Herbal (Botanical) Medicine. *Herbal Medicine*. CRC Press. 2011;28:405–418. DOI: 10.1201/b10787-20.
15. Murray M. T. *Vaccinium myrtillus* (Bilberry). *Textbook of Natural Medicine*. 2013;1080–1085. DOI: 10.1016/b978-1-4377-2333-5.00132-2.
16. Jayawardena R., Ranasinghe P., Galappathy P., Malkanthi R., Constantine G., Katulanda P. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. Springer Science and Business Media LLC. 2012;19:4–13. DOI: 10.1186/1758-5996-4-13.
17. Bjorklund G., Dadar M., Pivina L., Doşa M. D., Semenova Y., Aaseth J. The role of Zinc and Copper in insulin resistance and diabetes mellitus. *Current Medicinal Chemistry*. 2020;27(39):6643–6657. DOI: 10.2174/0929867326666190902122155.
18. Selvaraj S., Krishnaswamy S., Devashya V., Sethuraman S., Krishnan U. M. Flavonoid-metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews*. 2013;29;34(4):677–702. DOI: 10.1002/med.21301.
19. Kasprzak M. M., Erxleben A., Ochocki J. ChemInform abstract: properties and applications of flavonoid metal complexes. *Chem-Inform*. 2015;46(29):45853–45877. DOI: 10.1002/chin.201529267.
20. Da Silva H. C., De Souza L. A., Dos Santos H. F., De Almeida W. B. Determination of anticancer Zn(II)–Rutin complex structures in solution through density functional theory calculations of 1H NMR and UV–VIS spectra. *ACS Omega*. 2020;6;5(6):3030–3042. DOI: 10.1021/acsomega.9b04174.
21. Renny J. S., Tomasevich L. L., Tallmadge E. H., Collum D. B. Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;24;52(46):11998–12013. DOI: 10.1002/anie.201304157.
22. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossii Federatsii. XIV izdaniya [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 30.03.2021. (In Russ.)
23. Chukanova G. N. Modeling type 2 diabetes mellitus is a necessary foundation for study of medicinal products with antidiabetic potency. *Nauka i zdravookhraneie = Science and health care*. 2014;4:12–18. (In Russ.) DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60067-7.

Изменения в профиле жирных кислот печени крыс при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите

Е. Б. Шустов^{1,2}, А. В. Бунят^{3*}, А. Г. Платонова², О. М. Спасенкова², Н. В. Кириллова²,
Д. Ю. Ивкин², С. В. Оковитый², А. Н. Кимаев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», 192019, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова», 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

*Контактное лицо: Бунят Анна Валерьевна. E-mail: tkaannavaler12@gmail.com

ORCID: Е. Б. Шустов – <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>; А. В. Бунят – <https://orcid.org/0000-0002-4048-4754>; А. Г. Платонова – <https://orcid.org/0000-0002-3344-8026>;
О. М. Спасенкова – <https://orcid.org/0000-0002-2924-7651>; Н. В. Кириллова – <https://orcid.org/0000-0003-3379-0646>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;
С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; А. Н. Кимаев – <https://orcid.org/0000-0003-4899-5548>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 15.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – самое распространённое заболевание печени в мире. Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), являясь клинически прогрессирующей морфологической формой НАЖБП, занимает второе место в списке причин для пересадки печени у взрослого населения. В патогенезе данного заболевания важную роль играет метаболизм и распределение свободных жирных кислот (СЖК). Большое количество исследований установило, что уровень СЖК в периферической крови прямо коррелируют с тяжестью НАСГ, однако до сих пор отсутствует полная картина того, как изменяется спектр жирных кислот (ЖК) в печени при этом заболевании.

Цель. Изучение профиля жирных кислот в печени лабораторных животных при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите, вызванным высокожировой диетой и гиподинамией.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 17 белых беспородных крысах самцах, которые были рандомизированы на две группы – интактную ($n = 6$) и контрольную (стеатогепатит) ($n = 11$). Стеатогепатит моделировали 12-месячным применением гиперкалорийного высокожирового рациона на фоне гиподинамики. Содержание ЖК в печени определяли в реакции метанолиза при экстрагировании гексаном смеси их метиловых эфиров. Разделяли ЖК методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС). Калибровку для количественного расчета осуществляли по дейтерированной тридекановой кислоте. Исследовали содержание насыщенных и мононенасыщенных высших ЖК, их альдегидов и гидроксипроизводных, а также стеролов.

Результаты и обсуждение. Выявлено суммарное снижение содержания СЖК в печени животных со стеатогепатитом. Наиболее значимое снижение происходило преимущественно в классе мононенасыщенных ЖК и холестерина. Также установлено существенное снижение активности Δ^9 -десатуразы – ключевого фермента синтеза мононенасыщенных ЖК из их предшественника с той же длиной углеродной цепи, что проявилось достоверным снижением их количества в печени. Статистически значимых изменений в уровнях альдегидов и гидроксикислот между исследуемыми группами выявлено не было, также как и в уровне стеролов (кроме холестерина, содержание которого значимо уменьшалось).

Заключение. Таким образом, в печени крыс со стеатогепатитом, вызванным сочетанием гиперкалорийной диеты и гиподинамии, обнаружены статистически значимые изменения профиля и концентраций жирных кислот по сравнению со здоровыми животными. Продемонстрированные сдвиги состава ЖК могут отражать как адаптационные, так и патологические изменения в печени животных с НАЖБП и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: жирные кислоты, стеролы, стеатогепатит, неалкогольная жировая болезнь печени, газовая хромато-масс-спектрометрия, гиперкалорийная диета, гиподинамия

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

Вклад авторов. А. В. Бунят, С. В. Оковитый, Д. Ю. Ивкин разработали план и осуществили экспериментальное исследование. А. В. Платонова, О. М. Спасенкова и Н. В. Кириллова производили биохимические исследования. Е. Б. Шустов, А. Н. Кимаев произвели статистическую обработку и описание полученных результатов. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Шустов Е. Б., Бунят А. В., Платонова А. Г., Спасенкова О. М., Кириллова Н. В., Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В., Кимаев А. Н. Изменения в профиле жирных кислот печени крыс при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4–1):206–214. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-206-214](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-206-214)

Changes in Rat Liver Fatty Acid Profile in Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis

Evgeniy B. Shustov^{1,2}, Anna V. Bunyat^{3*}, Anna G. Platonova², Olga M. Spasenkova²,
Nadezhda V. Kirillova², Dmitry Yu. Ivkin², Sergey V. Okovityi², Aleksandr N. Kimaev²

¹ Institute of Toxicology Federal Medical Biological Agency of Russia, 1, Behterev str., Saint Petersburg, 192019, Russia

² Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ V. A. Almazov NMRC, 2, Akkuratov str., Saint Petersburg, 197341, Russia

*Corresponding author: Anna V. Bunyat. E-mail: tkaannavaler12@gmail.com

ORCID: Evgeniy B. Shustov – <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>; Anna V. Bunyat – <https://orcid.org/0000-0002-4048-4754>; Anna G. Platonova – <https://orcid.org/0000-0002-3344-8026>;

Olga M. Spasenkova – <https://orcid.org/0000-0002-2924-7651>; Nadezhda V. Kirillova – <https://orcid.org/0000-0003-3379-0646>;Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; Aleksandr N. Kimaev – <https://orcid.org/0000-0003-4899-5548>.

Received: 20.10.2021

Revised: 15.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease in the world. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a clinically progressive morphological form of NAFLD, ranks second in the list of reasons for liver transplantation in the adult population. In the pathogenesis of this disease, metabolism and distribution of free fatty acids (FFA) play an important role. A large number of studies have established that the level of FFA in peripheral blood directly correlates with the severity of NASH, but it is still unclear what effect fluctuations in the profile of fatty acids (FA) in the liver have in steatohepatitis.

Aim. Study of changes in the profile of fatty acids in the liver of laboratory animals with experimental non-alcoholic steatohepatitis.

Materials and methods. The study was carried out on 17 white outbred male rats, which were randomized into two groups – intact ($n = 6$) and control (steatohepatitis) ($n = 11$). Steatohepatitis was modeled by 12-month use of a hypercaloric high-fat diet against the background of hypodynamia. The content of fatty acids in the liver was determined in the reaction of methanolysis and extraction with a hexane mixture of their methyl esters. The LC was separated by gas chromatography-mass spectrometry. Calibration for quantitative calculation was carried out with deuterated tridecanoic acid. The content of saturated and monounsaturated higher FAs, their aldehydes and hydroxy derivatives, as well as sterols were studied.

Results and discussion. A total decrease in the content of FFA in the liver of animals with steatohepatitis was revealed. The most significant decrease occurred mainly in the class of monounsaturated fatty acids and cholesterol. Also, a significant decrease in the activity of Δ^9 -desaturase, a key enzyme in the synthesis of monounsaturated FAs from their precursor with the same carbon chain length, was revealed, which was manifested by a significant decrease in their amount in the liver. There were no statistically significant changes in the levels of aldehydes and hydroxy acids between the study groups, as well as in the level of sterols (except for cholesterol, the content of which decreased significantly).

Conclusion. Thus, in the liver of rats with steatohepatitis caused by a combination of a hypercaloric diet and hypodynamia, statistically significant changes in the profile and concentration of fatty acids were found in comparison with healthy animals. The demonstrated shifts in FA composition may reflect both adaptive and pathological changes in the liver of animals with NAFLD and require further study.

Keywords: fatty acids, sterols, steatohepatitis, non-alcoholic fatty liver disease, gas chromatography-mass spectrometry, hypercaloric diet, hypodynamia

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

Contribution of the authors. Anna V. Bunyat, Sergey V. Okovityi, Dmitry Yu. Ivkin developed a plan and carried out an experimental study. Anna G. Platonova, Olga M. Spasenkova and Nadezhda V. Kirillova performed biochemical studies. Evgeniy B. Shustov, Aleksandr N. Kimaev performed statistical processing and description of the results. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Shustov E. B., Bunyat A. V., Platonova A. G., Spasenkova O. M., Kirillova N. V., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V., Kimaev A. N. Changes in rat liver fatty acid profile in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(4-1):206–214. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-206-214](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-206-214)

ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – метаболическое заболевание, связанное с избыточным накоплением липидов в печени (более 5 % гепатоцитов), включающее широкий спектр состояний от стеатоза до стеатогепатита и гепатоцеллюлярной карциномы [1].

Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) – клинически прогрессирующая форма неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Это заболевание, на фоне избыточного отложения триглицеридов в гепатоцитах, сопровождается наличием воспаления, некроза и фиброза печени. НАСГ является самостоятельной нозологической единицей и характеризуется повышением активности печеночных ферментов в сыворотке

крови и морфологическими изменениями в печени по результатам биопсии [2].

НАЖБП является одной из наиболее распространенных заболеваний печени. В Соединенных Штатах она занимает 20–30 % в структуре популяции, в азиатских странах – 12–24 % [3]. В Российской Федерации, согласно результатам Всероссийского эпидемиологического исследования распространенности НАЖБП у более чем 50 тысяч амбулаторных пациентов, она выявлена у 37,3 %. Факторами риска заболевания в человеческой популяции являются мужской пол, избыточная масса тела и ожирение, гипергликемия и гипертриглицеридемия [4].

В патогенезе НАЖБП важную роль играет комплекс факторов, таких как липотоксичность, инсулино-резистентность, воспаление, окислительный стресс и

др. [2]. Возникающий в результате этих факторов дисбаланс в липогенезе *de novo*, липолизе и бета-окислении ЖК приводит к высвобождению в кровоток избыточного количества свободных жирных кислот (СЖК) [5]. Это, в свою очередь способствует периферической и печеночной инсулинерезистентности, а также ухудшает базальное и стимулированное инсулином поглощение глюкозы мышцами за счет блокирования передачи сигналов инсулина [6]. На фоне инсулинерезистентности, способность жировой ткани метаболизировать поглощенные СЖК с периферии ограничена, поэтому избыток липидов накапливается в виде эктопического жира и развивается липотоксичность [7]. Доказано, что уровень СЖК в периферической крови коррелируют с тяжестью НАСГ [8], однако данные об изменениях в профиле жирных кислот в различных тканях и органах (в частности – печени) у таких пациентов немногочисленны.

При изучении профиля ЖК в эритроцитах у пациентов с фиброзом печени было показано, что у больных с тяжелым течением НАЖБП в мембранах эритроцитов отмечается снижение индекса насыщенности (SI), определяемого как отношение содержания стеариновой кислоты (C18:0) к олеиновой кислоте (C18:1) [9–11]. У пациентов с прогрессирующим фиброзом печени в мембранах эритроцитов отмечено более высокое содержание насыщенных и мононенасыщенных ЖК и более низкие значения полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с пациентами с легким течением заболевания [12]. Таким образом, показана отрицательная корреляционная связь между количеством в мембранах эритроцитов ненасыщенных пальмитолеиновой, эйкозопентаеновой, докозопентаеновой, докозогептаеновой кислот и положительная связь между содержанием в них насыщенной пальмитиновой кислоты и прогрессированием фиброза печени при стеатогепатите [9, 13].

Изменение метаболизма ЖК при избыточном поступлении липидов в организм экспериментальных животных и НАЖБП изучалось в нескольких исследованиях. Было выявлено, что при однократном поступлении в организм лабораторных мышей эмульсии липидов, в жировой ткани с большей вероятностью накапливаются нечетные жирные кислоты, и скорость их метаболизма ниже, чем четных [14]. В печени мышей с генетически детерминированной тучностью (линия C57BLKS/J-lepr^{db/db}) распределение ненасыщенных жирных кислот было значительно увеличено по сравнению с худыми мышами обычной линии C57BLKS/J (на 20 % увеличилось содержание олеиновой кислоты и линолевой кислоты ($p < 0,05$), и наоборот, насыщенные жирные кислоты, пальмитиновая кислота и стеариновая кислота были снижены на 15 % и 32 %, соответственно, у мышей с ожирением [15]. Кроме того, в том же исследовании было продемонстрировано, что насыщенные ЖК способствуют TLR4-опосредованной активации ядерного фактора каппа B (NF-кВ), а ненасыщенные жирные кисло-

ты этому препятствуют. Так как NF-кВ индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов в жировой ткани печени, то можно предположить, что накопление насыщенных ЖК в печени лабораторных животных является отягчающим фактором при НАЖБП [17].

Более точное представление динамики и влияния изменений в профиле ЖК печени при неалкогольном стеатогепатите может приблизить к полноценному пониманию патогенеза данного заболевания. Кроме того, это может позволить использовать ЖК и их рецепторы в качестве фармакологических мишней действия лекарственных средств, замедляющих или прекращающих развитие липидной инфильтрации гепатоцитов.

Целью настоящей работы стало изучение изменений в профиле жирных кислот в печени лабораторных животных при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите, вызванном высокожировой диетой и гиподинамией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводили согласно требованиям решения совета Евразийского экономического союза в Сфере обращения лекарственных средств от 03.11.2016 г. № 81, с одобрения биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, протокол БЭК NAFLD-Rats-2020 от 18.01.2020 г.

Лабораторные животные – белые беспородные крысы самцы массой 257 ± 27 г, были получены из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.).

Для моделирования стеатогепатита была использована модификация модели гиперкалорийной высокожировой диеты [17] с составом: стандартный корм [65,5 % от общей массы корма (здесь и далее)], теплый говяжий жир (20 %), изолированный соевый белок (5 %), д-фруктоза (5 %), холин (2 %), холестерин (0,5 %), добавлением натрия глутамата (1 %) и жидкого экстракта креветок (1 %), в сочетании с условиями гиподинамии. Такая диета оказывает влияние на жировой и углеводный обмен животных, способствуя развитию у них стеатоза печени и формированию дисгликемии.

После завершения 14-дневного карантина лабораторные животные были рандомизированы на две группы: интактную ($n = 6$) и контрольную – с моделированием жировой болезни печени ($n = 11$). Интактных животных содержали в вентилируемых клетках (Tecniplast, Италия) при температуре воздуха 20–22 °C, относительной влажности 40–60 %, световом режиме 12:12. Животные контрольной группы находились в условиях гиподинамии (клетках с ячейками, ограничивающими пространство для одной особи, размерами 11 × 18 см) со свободным доступом к воде, и получали в течение 12 месяцев высокожировую диету.

По окончании эксперимента предварительно наркотизированных животных (хлоралгидрат, 350 мг/кг, Merck KGaA, Германия) подвергали эвтаназии, печень извлекали и делали навески массой 5,4 мг. Кроме то-

го, образцы фиксировали в формалине для гистологического исследования. Методом метанолиза сложных липидов в 400 мкл 1 М раствора соляной кислоты в метаноле, в течение 50 минут при 80 °C освобождали жирные кислоты в виде метиловых эфиров. Далее экстрагировали их гексаном (400 мкл), высушивали и обрабатывали в 25 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 7–8 мин при 80 °C для получения триметилсilyльных эфиров гидрокси-кислот.

Смесь эфиров в количестве 2 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы 7820N-5975 (Agilent Technologies, США) посредством автоматической системы ввода проб, которая обеспечивает воспроизводимость времен удерживания хроматографических пиков и повышает точность автоматической обработки данных. Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms Agilent Technologies длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм, газ-носитель – гелий. Режим анализа – программируемый, скорость нагрева термостата колонки 7 °C/мин в диапазоне 125–320 °C. Выдержка при начальной температуре 1,5 мин. Температура испарителя – 280 °C, соединительного элемента двух приборов – 270 °C, масс-спектрометра – 150–230 °C. Масс-спектрометр – квадрупольный, с ионизацией электронами (70 эВ) использовали в режиме селективных ионов, или масс-фрагментографии, при периодическом сканировании до тридцати ионов в пяти интервалах времени.

Площади пиков маркеров на масс-фрагментограммах интегрировали автоматически по заданной программе с использованием внутреннего стандарта. Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах Excel. Для количественного расчета использовали данные калибровки по дейтерированной тридекановой кислоте. Найденные пики были разделены на высшие ЖК насы-

щенные и ненасыщенные (монодиеновые), альдегиды ЖК, гидроокси-ЖК и стерины.

В качестве биомаркера повреждения печени использовали индекс активности стероил-коA-десатуразы, определяемой как отношение C16:1ω7/C16:0 жирных кислот в составе триглицеридов плазмы [18–20].

Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики, непараметрического дисперсионного анализа с помощью пакета «Анализ данных» процессора таблиц Excel и специализированной программы статистической обработки данных Statistica v.10. Достоверность различий между группами оценивалась по непараметрическому критерию дисперсионного анализа рангов (тест Краскела – Уоллиса).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе содержания в печени ЖК различных классов обращает на себя внимание существенное снижение суммарного содержания жирных кислот в органе (таблица 1).

Наиболее отчетливо это снижение происходит в классах мононенасыщенных жирных кислот, несколько слабее – для насыщенных жирных кислот. Содержание минорных фракций жирных кислот – их альдегидов и гидрокси-производных, оказалось на низком уровне.

Среди представителей насыщенных жирных кислот при моделировании стеатогепатита статистически значимой динамики не было обнаружено, за исключением додекановой (лауриловой) кислоты, для которой отмечалась тенденция к снижению ее содержания в печени (таблица 2). Однако вкладом этого снижения в общую динамику содержания насыщенных кислот в тканях печени можно пренебречь, так как лауриловая кислота занимает 2–3 % в структуре этой группы ЖК.

Важным является тот факт, что ни для одной из насыщенных жирных кислот не выявлено их накопление в печени. Это подтверждается также тем, что в профи-

Таблица 1. Суммарное содержание жирных кислот разных классов в печени исследуемых групп животных ($M \pm m$, мкг/г ткани)

Table 1. The total content of fatty acids of different classes and sterols in the liver of the studied groups of animals ($M \pm m$, mcg/g of tissue)

Жирные кислоты Fatty acids	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals	Эффект моделирования, % от интактных Modeling effect, % of intact	Достоверность различий, р Significance of differences, p
Насыщенные ЖК Saturated FAs	740 ± 168	544 ± 49	-27	<0,05
Мононенасыщенные ЖК Monounsaturated FAs	636 ± 62	338 ± 48	-47	<0,005
Альдегиды ЖК Aldehydes FAs	26 ± 7	30 ± 4	+17	>0,1
Гидрокси-ЖК Hydroxy-FAs	8 ± 2	6 ± 1	-27	>0,1
Суммарное количество жирных кислот Total fatty acids	1551 ± 22	999 ± 97	-36	<0,05

Таблица 2. Изменение содержания насыщенных жирных кислот в печени крыс при моделировании стеатогепатита ($M \pm m$, мкг/г ткани)

Table 2. Changes in the content of saturated fatty acids in rats liver when modeling steatohepatitis ($M \pm m$, mcg/g of tissue)

Насыщенная жирная кислота Saturated fatty acid	Группа животных Group of animals		Эффект моделирования, % от интактных Modeling effect, % of intact	Достоверность различий, p Significance of differences, p
	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals		
Изотетрадекановая Isotetradecanoic	2,6 ± 0,6	2,1 ± 0,6	-27	>0,1
Изопентадекановая Isopentadecanoic	7,5 ± 1,7	6,2 ± 1,8	-17	>0,1
Антеизопентадекановая Anteisopentadecanoic	7,0 ± 1,4	6,4 ± 1,6	-7	>0,1
Изогексадекановая Isohexadecanoic	35,4 ± 6,3	25,4 ± 4,7	-28	>0,1
Гептадекановая Heptadecanoic	566 ± 143	403 ± 35	-29	>0,1
Изононадекановая Isononadecanoic	8,3 ± 1,6	7,6 ± 1,7	-8	>0,1
Антеизогептадекановая	43,0 ± 7,6	41,0 ± 5,1	-5	>0,1
Додекановая Dodecanoic	20,6 ± 6,2	11,1 ± 1,9	-45	<0,1
Антеизононадекановая Anteisononadecanoic	50,1 ± 3,9	41,1 ± 5,0	-17	>0,1
Насыщенные ЖК (суммарно) Saturated fatty acids (in total)	740 ± 167	544 ± 49	-27	<0,05

ле насыщенных жирных кислот не происходит изменения их структуры. Так, в интактной группе животных ведущую роль в пуле насыщенных жирных кислот играет гептадекановая или стеариновая кислота, доля которой среди всех насыщенных кислот печени составляет 76,5 %. При моделировании стеатогепатита ее доля составляет 74,1 %. Вторую по значимости группу образуют антеизононадекановая, антеизогептадекановая и изогексадекановая кислоты, доля каждой из которых у животных интактной группы составляет 6,7 %, 5,8 % и 4,8 % соответственно. При моделировании стеатогепатита их доля составила 7,6 %, 7,5 % и 4,7 % соответственно.

Моделирование стеатогепатита у лабораторных животных сопровождалось выраженным (в 2 раза) и статистически значимым снижением содержания мононенасыщенных жирных кислот в печени (таблица 3). Наиболее существенным было уменьшение содержания 9-тетрадеценовой, 7-гексадеценовой, 11-октадеценовой и транс-9-гексадеценовых кислот. На уровне статистических тенденций отмечалось снижение содержания 9-изогексадеценовой и 9-гептадеценовой кислоты.

Наиболее значимую роль играли изменения 11-октадеценовой и транс-9-гексадеценовой кислот, доля которых среди всех мононенасыщенных кислот печени в группе интактных животных достигает 54,8 % и 20,4 %. При моделировании стеатогепатита их доля составила 57,5 % и 13,2 % соответственно. Вторую по значимости группу образуют 7-гексадеценовая и 9-гептадеценовая кислоты, доля которых составляет 7,6 % и 3,7 % соответственно. При моделировании сте-

атогепатита их количество было определено в 5,7 % и 3,2 % соответственно. Вероятно, такое скоординированное снижение содержания этих кислот отражает возникающие при стеатогепатите нарушения в синтезе соответствующих жирных кислот.

Наряду с ЖК определенную роль в физико-химических свойствах клеточных мембран играют альдегиды жирных кислот. Они являются промежуточными продуктами окисления жирных кислот, предшественниками синтеза простагландинов. В группе минорных представителей жирных кислот (альдегиды ЖК и гидрокси-ЖК кислоты) их содержание в тканях печени при моделировании стеатогепатита изменилось незначительно. В таблице 4 представлены данные по представителям этих групп жирных кислот, сдвиги содержания которых носят достоверный характер. Однако даже для них, в связи с крайне низкой представленностью, этими сдвигами можно пренебречь.

Для остальных представителей минорных ЖК (альдегид изогексадекановой, альдегид 11-октадеценовой, альдегид изогептадекановой, альдегид изотетрадеканой, 3-гидроксидодекановой, 3-гидрокситетрадекановой, 3-гидроксигексадекановой, 10-гидроксиоктадекановой, 2-гидроксидокозаной, 2-гидрокситетракозановой, 2-гидроксигексакозановой) статистически значимых изменений в их содержании в печени при моделировании стеатогепатита выявлено не было.

В группе стеролов не выявлено существенной динамики их содержания в тканях печени при моделировании стеатогепатита, за исключением холестерина,

Таблица 3. Изменение содержания мононенасыщенных жирных кислот в печени крыс при моделировании стеатогепатита ($M \pm m$, мкг/г ткани)

Table 3. Changes in the content of monounsaturated fatty acids in rats liver when modeling steatohepatitis ($M \pm m$, mcg/g of tissue)

Мононенасыщенная жирная кислота Monounsaturated fatty acid	Группа животных Group of animals		Эффект моделирования, % от интактных Modeling effect, % of intact	Достоверность различий, р Significance of differences, p
	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals		
9-тетрадеценовая 9-tetradecenoic	2,1 ± 0,5	0,7 ± 0,1	-68	<0,005
11-тетрадеценовая 11-tetradecenoic	7,7 ± 2,1	5,0 ± 1,6	-35	>0,1
7-пентадеценовая 7-pentadecenoic	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,1	-51	>0,1
9-изо-гексадеценовая 9-iso-hexadecenoic	0,8 ± 0,5	0,1 ± 0,1	-85	<0,1
7-гексадеценовая 7-hexadecenoic	48,6 ± 12,8	19,3 ± 2,4	-60	<0,01
11-октадеценовая 11-octadecenoic	349 ± 35	194 ± 25	-44	<0,005
9-гептадеценовая 9-heptadecenoic	23,2 ± 7,6	10,7 ± 2,2	-54	<0,1
11-эйкозеновая 11-eicosenic	25,5 ± 3,7	20,9 ± 3,9	-18	>0,1
транс-9-гексадеценовая trans-9-hexadecenoic	129 ± 28	44 ± 13	-65	<0,01
11-гексадеценовая 11-hexadecenoic	9,1 ± 2,7	12,5 ± 4,6	+37	>0,1
7-тетрадеценовая 7-tetradecenoic	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	-20	>0,1
9-эйкозеновая 9-eicosenic	39,6 ± 6,2	28,7 ± 3,7	-28	>0,1
Мононенасыщенные ЖК (суммарно) Monounsaturated FA (total)	636 ± 85	338 ± 47	-47	<0,005

уровень которого снижался практически в 3 раза по сравнению с контролем (таблица 5).

Обращает на себя внимание, что доля стеролов в печени животных разных групп не меняется, хотя их абсолютное количество становится меньше. Оно сопоставимо с общим снижением содержания ЖК в тка-

нях печени (-36%). Это снижение может быть частично объяснено снижением клеточной массы печени, обусловленной некротическими и апоптотическими изменениями. Однако для холестерина снижение его содержания в тканях печени было существенно более выражено (-61%). Достаточно высокая избыточ-

Таблица 4. Изменение содержания минорных жирных кислот в печени при моделировании стеатогепатита (мкг/г ткани, $M \pm m$)

Table 4. Changes in the content of minor fatty acids in liver during modeling of steatohepatitis (mcg/g of tissue, $M \pm m$)

Жирная кислота Fatty acid	Группа животных Group of animals		Эффект моделирования, % от интактных Modeling effect, % of intact	Достоверность различий, р Significance of differences, p
	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals		
Альдегид тетрадекановой кислоты Tetradecanoic acid aldehyde	2,3 ± 0,5	1,4 ± 0,1	-37	<0,05
Альдегид 9-октадеценовой кислоты Aldehyde of 9-octadecene acid	7,4 ± 1,2	16,1 ± 2,4	+120	<0,05
Aldehydes FAs (sum-marno)	25,8 ± 7,1	30,3 ± 3,8	+17	>0,1
3-гидрокситетрадекановая кислота 3-hydroxytetradecanoic acid	0,55 ± 0,13	0,24 ± 0,04	-58	<0,05
10-гидроксиоктадекановая кислота 10-hydroxyoctadecanoic acid	3,19 ± 0,97	1,17 ± 0,22	-64	<0,05
Гидроксикислоты (суммарно) Hydroxy acids (total)	8,17 ± 1,77	6,00 ± 0,83	-23	>0,1

Таблица 5. Изменение содержания стеролов в печени при моделировании стеатогепатита (мкг/г ткани, $M \pm m$)

Table 5. Changes in the content of sterols in liver during modeling of steatohepatitis (mcg/g of tissue, $M \pm m$)

Стерол Sterol	Группа животных Group of animals		Эффект моделирования, % от интактных Modeling effect, % of intact	Достоверность различий, p Significance of differences, p
	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals		
Копростенол Coprostanol	2,6 ± 0,6	3,2 ± 1,1	+24	>0,1
Холестендиол Cholestanediol	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2	-13	>0,1
Кампестерол Campesterol	21,0 ± 4,3	18,2 ± 0,9	-30	>0,1
Холестадиенон Cholestanone	1,3 ± 0,9	1,7 ± 0,6	+33	>0,1
β-ситостерол β-sitosterol	24,6 ± 4,8	19,4 ± 0,8	-21	>0,1
Холестерол Cholesterol	91,9 ± 13,9	36,3 ± 9,83	-61	<0,01
Стеролы (суммарно) Sterols (total)	143,6 ± 22,5	81,1 ± 13,3	-44	<0,05

ная разница не позволяет отнести снижение тканевого уровня холестерина к последствию только гибели гепатоцитов, но может быть связана с угнетением его синтеза.

Известно, что биологическим маркером активности синтеза ненасыщенных жирных кислот является активность печеночного фермента Δ^9 -десатуразы, определяемого по отношению содержания ненасыщенной ЖК к концентрации ее предшественника (насыщенной ЖК) [20]. Среди жирных кислот, содержание которых определялось в данном исследовании, для оценки активности десатуразы была использована пара 9-гептадециновая и гептадекановая кислоты (таблица 6).

Таблица 6. Содержание 9-гептадециновой и гептадекановой кислот в печени при моделировании стеатогепатита

Table 6. The content of 9-heptadecenoic and heptadecanoic acids in the liver during modeling of steatohepatitis

Показатель Index	Интактные животные (среднегрупповые значения, $n = 6$) Intact animals (mean group values, $n = 6$)	Контрольные животные (среднегрупповые значения, $n = 11$) Control animals (mean group values, $n = 11$)
Гептадекановая кислота (мкг/г ткани) Heptadecanoic acid (mcg/g tissue)	566	403
9-гептадециновая кислота (мкг/г ткани) 9-heptadecene acid (mcg/g tissue)	23,2	10,7
Индекс активности Δ^9 -десатуразы (отн.ед) Δ^9 -desaturase activity index (rel.units)	0,041	0,027

Анализ данных показывает, что в ходе моделирования стеатогепатита гиперкалорийным высоколипидным рационом питания у лабораторных животных возникло снижение синтеза 9-гептадециновой и гептадекановой кислот соответственно в 2,2 и 1,4 раза.

Еще одна реакция, связанная с синтезом жирных кислот – элонгация, ведущая к наращиванию длины цепи. В случае повышения активности элонгазы должен наблюдаться сдвиг структуры представленности ЖК в сторону роста длины цепи, а при угнетении – снижение доли длинноцепочечных жирных кислот. Данные, характеризующие структуру представленности насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в печени в зависимости от длины цепи, представлены в таблице 7.

Для мононенасыщенных жирных кислот происходит некоторое снижение доли изоформ гексадециновой кислоты (на 7 %) при увеличении доли изоформ октадециновой (+5 %) и эйкозеновой (+5 %) кислот. Статистически значимой такая перестройка структуры представленности мононенасыщенных жирных кислот в печени при моделировании стеатогепатита не является в связи с относительно небольшим числом наблюдений в интактной группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в печени крыс со стеатогепатитом, вызванным сочетанием гиперкалорийной диеты и гиподинамией, обнаружены статистически значимые изменения профиля и концентраций жирных кислот по сравнению со здоровыми животными – снижение количества как мононенасыщенных, так и насыщенных ЖК. Выявлен факт отсутствия накопления насыщенных ЖК в печени крыс с патологией. Кроме того, при стеатогепатите снижалась активность 5-десатуразы. Продемонстрированные сдвиги состава ЖК могут

отражать как адаптационные, так и патологические изменения в печени животных с НАЖБП и требуют дальнейшего изучения.

Таблица 7. Структура представленности жирных кислот в печени в зависимости от длины цепи (% от суммарной массы соответствующего типа жирных кислот)

Table 7. Structure of fatty acid representation in liver depending on the chain length (% of the total mass of the corresponding type of fatty acids)

Длина цепи Chain length	Насыщенные жирные кислоты Saturated fatty acids		Мононенасыщенные жирные кислоты Monounsaturated fatty acids	
	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals	Интактные животные Intact animals	Контрольные животные Control animals
C14	0,5	0,5	1,9	1,9
C15	2	2	0,1	0,1
C16	4,5	4,5	30	23
C17	82	82	4	3
C18	0	0	54	57
C19	8	9	0	0
C20	3	2	10	15
Длинноцепочечные жирные кислоты (C19-C20) суммарно Long-chain fatty acids (C19-C20) in total	11	11	10	15

ЛИТЕРАТУРА

- Лазебник Л. Б., Голованова Е. В., Туркина С. В., Райхельсон К. Л., Оковитый С. В., Драпкина О. М., Маев И. В., Мартынов А. И., Ройтберг Г. Е., Хлыниова О. В., Абдулганиева Д. И., Алексеенко С. А., Ардатская М. Д., Бакулин И. Г., Бакулина Н. В., Буеверов А. О., Виницкая Е. В., Волынец Г. В., Еремина Е. Ю., Гриневич В. В., Долгушина А. И., Казюлин А. Н., Кашкина Е. И., Козлова И. В., Конев Ю. В., Корочанская Н. В., Кравчук Ю. А., Ли Е. Д., Лоранская И. Д., Махов В. М., Мехтиев С. Н., Новикова В. П., Остроумова О. Д., Павлов Ч. С., Радченко В. Г., Самсонов А. А., Сарсенбаева А. С., Сайфутдинов Р. Г., Селиверстов П. В., Ситкин С. И., Стефанюк О. В., Тарасова Л. В., Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П., Фоминых Ю. А., Хавкин А. И., Цыганова Ю. В., Шархун О. О. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;(1):4–52. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52.
- European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;64(6):1388–1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.
- Chalasani N., Younossi Z., Lavine J. E., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison S. A., Brunt E. M., Sanyal A. J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice
- guidance from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–57. DOI: 10.1002/hep.29367.
- Драпкина О. М., Ивашин В. Т. Эпидемиологические особенности неалкогольной жировой болезни печени в России (результаты открытого многоцентрового проспективного исследования наблюдения DIREGL 01903). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014;24(4):32–38.
- Saponaro C., Gaggini M., Carli F., Gastaldelli A. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: a critical point in metabolic. *Homeostasis. Nutrients*. 2015;7(11):9453–9474. DOI: 10.3390/nu7115475.
- Boden G., Lebed B., Schatz M., Homko C., Lemieux S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes*. 2001;50(7):1612–1617. DOI: 10.2337/diabetes.50.7.1612.
- Rada P., González-Rodríguez A., García-Monzón C., Valverde Á. M. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death & Disease*. 2020;11(9):802. DOI: 10.1038/s41419-020-03003-w.
- Pardo V., González-Rodríguez A., Muntane J., Kozma S. C., Valverde Á. M. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;80:298–309. DOI: 10.1016/j.fct.2015.03.029.
- Cansancao K., Monteiro L. S., Leite N. C., Davalos A., do Carmo M. G. T., Peres W. A. F. Advanced liver fibrosis is independently associated with palmitic acid and insulin levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2018;10(11):1586. DOI: 10.3390/nu10111586.
- Hodson L., Bhatia L., Scorletti E., Smith D. E., Jackson N. C., Shojaae-Moradie F., Umpleby M., Calder P. C., Byrne C. D. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017;71(8):973–979. DOI: 10.1038/ejcn.2017.145.
- Notarnicola M., Caruso M. G., Tutino V., Bonfiglio C., Cozzolongo R., Giannuzzi V., De Nunzio V., De Leonardi G., Abbrescia D. I., Franco I., Intini V., Mirizzi A., Osella A. R. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):160–167. DOI: 10.1186/s12944-017-0552-0.
- Maciejewska D., Marlicz W., Ryterska K., Banaszczak M., Jamioł-Milc D., Stachowska E. Changes of the fatty acid profile in erythrocyte membranes of patients following 6-month dietary intervention aimed at the regression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018;2018:5856201. DOI: 10.1155/2018/5856201.
- Maciejewska D., Drodz A., Ossowski P., Ryterska K., Jamioł-Milc D., Banaszczak M., Raszeja-Wyszomirska J., Kaczorowska M., Sabinicz A., Stachowska E. Fatty acid changes help to better understand regression of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(1):301–310. DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.301.
- Goton N., Moroda K., Watanabe H., Yoshinaga K., Tanaka M., Mizobe H., Ichioka K., Tokairin S., Wada S. Metabolism of odd-numbered fatty acids and even-numbered fatty acids in mouse. *Journal of Oleo Science*. 2008;57(5):293–299. DOI: 10.5650/JOS.57.293.
- Li M., Fu W., Li X.-A. Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese mice. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010;3(4):303–307.
- Figueiredo P. S., Inada A. C., Marcelino G., Cardozo C. M. L., Freitas K. C., Guimarães R. C. A., de Castro A. P., do Nascimento V. A., Hiane P. A. Fatty acids consumption: the role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*. 2017;9(10):1158. DOI: 10.3390/ijms21114093.
- Xu B. L., Wang R., Ma L., Dong W., Zhao W., Zhang Z., Wang J., Zhang X. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. *BioMed Research International*. 2015;2(1):1–7. DOI: 10.1155/2015/759803.

18. Осиенко А. Н. Жирные кислоты и их альдегиды как участники атеросклеротического процесса. *Сибирский медицинский журнал*. 2012;27(2):122–126.
19. Kang M., Lee A., Yoo H. J., Kim M., Shin D. Y. Association between increased visceral fat area and alterations in plasma fatty acid profile in overweight subjects: a crosssectional study. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):248–257. DOI: 10.1186/s12944-017-0642-z.
20. Lee J. J., Lambert J. E., Hovhannisyan Y., Ramos-Roman M. A., Trombold J. R., Wagner D. A., Parks E. J. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;101(1):34–43. DOI: 10.3945/ajcn.114.092262.
10. Hodson L., Bhatia L., Scorletti E., Smith D. E., Jackson N. C., Shoaee-Moradie F., Umpleby M., Calder P. C., Byrne C. D. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017;71(8):973–979. DOI: 10.1038/ejcn.2017.145.
11. Notarnicola M., Caruso M. G., Tutino V., Bonfiglio C., Cozzolongo R., Giannuzzi V., De Nunzio V., De Leonardi G., Abbrescia D. I., Franco I., Intini V., Mirizzi A., Osella A. R. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):160–167. DOI: 10.1186/s12944-017-0552-0.
12. Maciejewska D., Marlicz W., Ryterska K., Banaszczak M., Jamioł-Milc D., Stachowska E. Changes of the fatty acid profile in erythrocyte membranes of patients following 6-month dietary intervention aimed at the regression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018;2018:5856201. DOI: 10.1155/2018/5856201.
13. Maciejewska D., Drozd A., Ossowski P., Ryterska K., Jamioł-Milc D., Banaszczak M., Raszeja-Wyszomirska J., Kaczorowska M., Sabinicz A., Stachowska E. Fatty acid changes help to better understand regression of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(1):301–310. DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.301.
14. Goton N., Moroda K., Watanabe H., Yoshinaga K., Tanaka M., Mizobe H., Ichioka K., Tokairin S., Wada S. Metabolism of odd-numbered fatty acids and even-numbered fatty acids in mouse. *Journal of Oleo Science*. 2008;57(5):293–299. DOI: 10.5650/JOS.57.293.
15. Li M., Fu W., Li X.-A. Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese mice. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010;3(4):303–307.
16. Figueiredo P. S., Inada A. C., Marcelino G., Cardozo C. M. L., Freitas K. C., Guimarães R. C. A., de Castro A. P., do Nascimento V. A., Hiane P. A. Fatty acids consumption: the role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*. 2017;9(10):1158. DOI: 10.3390/ijms21114093.
17. Xu B. L., Wang R., Ma L., Dong W., Zhao W., Zhang Z., Wang J., Zhang X. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. *BioMed Research International*. 2015;2(1):1–7. DOI: 10.1155/2015/759803.
18. Osipenko A. N. Fatty acids and their aldehydes as participants in the atherosclerotic process. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2012;27(2):122–126. (In Russ.).
19. Kang M., Lee A., Yoo H. J., Kim M., Shin D. Y. Association between increased visceral fat area and alterations in plasma fatty acid profile in overweight subjects: a crosssectional study. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):248–257. DOI: 10.1186/s12944-017-0642-z.
20. Lee J. J., Lambert J. E., Hovhannisyan Y., Ramos-Roman M. A., Trombold J. R., Wagner D. A., Parks E. J. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;101(1):34–43. DOI: 10.3945/ajcn.114.092262.

REFERENCES

1. Lazebnik L. B., Golovanova E. V., Turkina S. V., Raikhelson K. L., Okovityy S. V., Drapkina O. M., Maev I. V., Martynov A. I., Roitberg G. E., Khlynova O. V., Abdulganieva D. I., Alekseenko S. A., Ardatskaya M. D., Bakulin I. G., Bakulina N. V., Bueverov A. O., Vinitskaya E. V., Volynets G. V., Eremina E. Yu., Grinevich V. B., Dolgushina A. I., Kazyulin A. N., Kashkina E. I., Kozlova I. V., Konev Yu. V., Korochanskaya N. V., Kravchuk Yu. A., Li E. D., Loranskaya I. D., Makhov V. M., Mekhtiev S. N., Novikova V. P., Ostroumova O. D., Pavlov Ch. S., Radchenko V. G., Samsonov A. A., Sarsenbaeva A. S., Sayfutdinov R. G., Seliverstov P. V., Sitkin S. I., Stefanyuk O. V., Tarasova L. V., Tkachenko E. I., Uspensky Yu. P., Fominykh Yu. A., Khavkin A. I., Tsyanova Yu. V., Sharhun O. O. Non-alcoholic fatty liver disease in adults: clinical picture, diagnosis, treatment. Guidelines for therapists, third version. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;(1):4–52. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52.
2. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;64(6):1388–1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.
3. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J. E., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison S. A., Brunt E. M., Sanyal A. J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–57. DOI: 10.1002/hep.29367.
4. Drapkina O. M., Ivashkin V. T. Epidemiological features of non-alcoholic fatty liver disease in Russia (results of an open multicenter prospective observation study DIREGL 01903). *Rossijskij zhurnal gastroenterologii, hepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2014;24(4):32–38. (In Russ.)
5. Saponaro C., Gaggini M., Carli F., Gastaldelli A. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: a critical point in metabolic. *Homeostasis. Nutrients*. 2015;7(11):9453–9474. DOI: 10.3390/nu7115475.
6. Boden G., Lebed B., Schatz M., Homko C., Lemieux S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes*. 2001;50(7):1612–1617. DOI: 10.2337/diabetes.50.7.1612.
7. Rada P., González-Rodríguez A., García-Monzón C., Valverde Á. M. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death & Disease*. 2020;11(9):802. DOI: 10.1038/s41419-020-03003-w.
8. Pardo V., González-Rodríguez A., Muntane J., Kozma S. C., Valverde Á. M. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;80:298–309. DOI: 10.1016/j.fct.2015.03.029.
9. Cansancio K., Monteiro L. S., Leite N. C., Davalos A., do Carmo M. G. T., Peres W. A. F. Advanced liver fibrosis is independently associated with palmitic acid and insulin levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2018;10(11):1586. DOI: 10.3390/nu10111586.
10. Hodson L., Bhatia L., Scorletti E., Smith D. E., Jackson N. C., Shoaee-Moradie F., Umpleby M., Calder P. C., Byrne C. D. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017;71(8):973–979. DOI: 10.1038/ejcn.2017.145.
11. Notarnicola M., Caruso M. G., Tutino V., Bonfiglio C., Cozzolongo R., Giannuzzi V., De Nunzio V., De Leonardi G., Abbrescia D. I., Franco I., Intini V., Mirizzi A., Osella A. R. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):160–167. DOI: 10.1186/s12944-017-0552-0.
12. Maciejewska D., Marlicz W., Ryterska K., Banaszczak M., Jamioł-Milc D., Stachowska E. Changes of the fatty acid profile in erythrocyte membranes of patients following 6-month dietary intervention aimed at the regression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018;2018:5856201. DOI: 10.1155/2018/5856201.
13. Maciejewska D., Drozd A., Ossowski P., Ryterska K., Jamioł-Milc D., Banaszczak M., Raszeja-Wyszomirska J., Kaczorowska M., Sabinicz A., Stachowska E. Fatty acid changes help to better understand regression of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(1):301–310. DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.301.
14. Goton N., Moroda K., Watanabe H., Yoshinaga K., Tanaka M., Mizobe H., Ichioka K., Tokairin S., Wada S. Metabolism of odd-numbered fatty acids and even-numbered fatty acids in mouse. *Journal of Oleo Science*. 2008;57(5):293–299. DOI: 10.5650/JOS.57.293.
15. Li M., Fu W., Li X.-A. Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese mice. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010;3(4):303–307.
16. Figueiredo P. S., Inada A. C., Marcelino G., Cardozo C. M. L., Freitas K. C., Guimarães R. C. A., de Castro A. P., do Nascimento V. A., Hiane P. A. Fatty acids consumption: the role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*. 2017;9(10):1158. DOI: 10.3390/ijms21114093.
17. Xu B. L., Wang R., Ma L., Dong W., Zhao W., Zhang Z., Wang J., Zhang X. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. *BioMed Research International*. 2015;2(1):1–7. DOI: 10.1155/2015/759803.
18. Osipenko A. N. Fatty acids and their aldehydes as participants in the atherosclerotic process. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2012;27(2):122–126. (In Russ.).
19. Kang M., Lee A., Yoo H. J., Kim M., Shin D. Y. Association between increased visceral fat area and alterations in plasma fatty acid profile in overweight subjects: a crosssectional study. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):248–257. DOI: 10.1186/s12944-017-0642-z.
20. Lee J. J., Lambert J. E., Hovhannisyan Y., Ramos-Roman M. A., Trombold J. R., Wagner D. A., Parks E. J. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;101(1):34–43. DOI: 10.3945/ajcn.114.092262.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этичного поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науки:

- 02.00.00 – химические науки;
- 03.02.00 – общая биология;
- 03.03.00 – физиология;
- 14.04.00 – фармацевтические науки.

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем 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 предоставляет приоритет для аспирантских и докторских работ, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае 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 прохо-

дят 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=hdac5rtkb73ae0130fk4g8nrv1>)

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 РУНБ: <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-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: 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 образов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производитель, страну происхождения [Пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете в прослеживаемом формате, с четкими разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т.д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; s – стандартное квадратичное отклонение; r – 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 подобные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования, как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) 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](http://www.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. *Oncology*. 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. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 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 представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные 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 подрисуночных 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 номе-ру рисунка.



Испытательная лаборатория (Центр контроля качества лекарственных средств (ЦККЛС))

Испытательная лаборатория (Центр контроля качества лекарственных средств (ЦККЛС)) была создана на базе СПХФУ в 1994 году. Создание данного подразделения было обусловлено необходимостью проведения локального контроля качества ЛС в Северо-Западном регионе в связи с возрастающими объемами производства фармацевтической отрасли.

В структуре университета лаборатория осуществляет научно-практическую аналитическую функцию и ассилирует в себе исследования по всем направлениям фармакопейного анализа.

Лаборатория проводит как полный контроль качества, так и анализ по отдельным показателям спецификации в рамках утвержденной области аккредитации.



Область аккредитации испытательной лаборатории включает:

- Физико-химические методы анализа (спектральные в т. ч. АЭС с ИСП, хроматографические и др.).
- Фармацевтико-технологические методы (Распадаемость, Растворение, Однородность дозирования и др.).
- Химические методы контроля качества, в том числе титрование в неводной среде с использованием уксусного ангидрида.
- Биологические методы анализа (работа с лабораторными животными по показателю «Аномальная токсичность» и «Пирогенность» и микробиологические методы по определению показателей «МБЧ», «Антимикробная активность», «Стерильность» и др.).



Испытания могут быть проведены для следующих объектов:

- Лекарственные средства (активные фармацевтические субстанции и лекарственные препараты), зарегистрированные на территории Российской Федерации.
- Вспомогательные вещества.
- Химические методы контроля качества, в том числе титрование в неводной среде с использованием уксусного ангидрида.
- Биологически активные добавки.
- Лекарственное растительное сырье и сборы.
- Парфюмерно-косметическая продукция.

Возможно проведение анализов медицинских изделий, химических реагентов, стандартных образцов и пр.

Контакты:

Начальник ИЛ(ЦККЛС) – д-р фарм. наук **Инна Ивановна Тернинко**
Тел.: 449-39-00 (доб. 3301, 3300); e-mail: inna.terninko@pharminnotech.com



АСПИРАНТУРА В СПХФУ

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет – один из ведущих центров по подготовке научных и научно-педагогических кадров в области фармации, химии, биологии и биотехнологии.

Научные исследования ведутся под руководством ведущих специалистов, имеющих ученые степени докторов и кандидатов наук в тесной кооперации с научными организациями и индустриальными партнерами.

Подготовка научных и научно-педагогических кадров осуществляется по следующим научным специальностям:

- 1.4.3 Органическая химия.
- 1.4.10 Коллоидная химия.
- 1.5.4 Биохимия.
- 1.5.6 Биотехнология.
- 2.6.10 Технология органических веществ.
- 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология.
- 3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств.
- 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия.
- 3.4.3 Организация фармацевтического дела.

Подготовка диссертации на соискание ученой степени кандидата наук без освоения программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре возможно по следующим научным специальностям:

- 3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств.
- 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия.
- 3.4.3 Организация фармацевтического дела.



АСПИРАНТУРА – НАДЕЖНЫЙ ФУНДАМЕНТ КАРЬЕРЫ

Контактные данные Департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров СПХФУ:

Адрес: 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, лит. А
e-mail: opkvk@pharminnotech.com